

Université de Montréal

Régulation développementale *in vivo* de l'expression hypophysaire
du gène POMC

Par

Pierre-Luc Lavoie

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade

de Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Août 2006

© Pierre-Luc Lavoie, 2006



QH

506

U54

2007

V.003

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation développementale *in vivo* de l'expression hypophysaire
du gène POMC

Présenté par :

PierreLuc Lavoie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Muriel Aubry

Membre du jury : André Tremblay

Directeur de recherche : Jacques Drouin

Codirecteur : Aurélio Balsalobre

Mémoire accepté le : _____

Résumé

L'hypophyse constitue un lien central au niveau de l'intégration des divers signaux en provenance du cerveau ainsi que des organes périphériques. Elle est formée de trois lobes distincts : le lobe antérieur (pars distalis), intermédiaire (pars intermedia) et postérieur (pars nervosa). Deux des six lignées cellulaires hypophysaires, les corticotropes du lobe antérieur et les mélanotrope du lobe intermédiaire, expriment la pro-opiomélanocortine (POMC). Cette prohormone constitue le précurseur de plusieurs peptides biologiquement actifs, dont la corticotrophine (ACTH). Sous l'influence de la corticolibérine hypothalamique CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), la POMC produite dans les cellules corticotropes est maturée en ACTH qui régulera ensuite la synthèse de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Cette boucle de rétroaction est appelée l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). D'ailleurs, l'hypothalamus et l'hypophyse forment une unité impliquée dans plusieurs axes de régulation où ils exercent un contrôle sur une grande variété d'activités physiologiques.

Divers facteurs sont impliqués dans la transcription du gène POMC. Parmi eux, notons le bHLH NeuroD1 et le récepteur nucléaire orphelin Nur77. Ceux-ci trouvent leurs éléments de réponse respectifs, la boîte E_{neuro} et le NurRE, au niveau de la partie distale du promoteur POMC. Puisque NeuroD1 possède une cinétique d'expression variable au cours du développement hypophysaire et que Nur77 n'est actif qu'en présence de CRH, nous avons produit des souris transgéniques exprimant le gène rapporteur EGFP sous le contrôle du promoteur POMC intact, avec une boîte E_{neuro} mutée ou bien avec un NurRE muté. Les données obtenues ont amené de nouvelles explications sur les dynamiques d'expression du gène POMC. Par rapport aux études précédentes effectuées sur des cellules en culture, les lignées mutantes ont permis d'envisager de façon indépendante l'importance *in vivo* de la boîte E_{neuro} et du NurRE dans la régulation développementale de l'expression hypophysaire du gène POMC.

Mots clés : Transcription, boîte E_{neuro} , NurRE, NeuroD1, Nur77.

Abstract

The pituitary gland is a central link for the integration of many signals from the brain and the periphery. The gland is formed of three lobes: the anterior lobe (pars distalis), the intermediate lobe (pars intermedia) and the posterior lobe (pars nervosa). From the six pituitary cell types, two of them, the corticotrophs of the anterior lobe and the melanotrophs of the intermediate lobe, express the proopiomelanocortin gene (POMC). This prohormone is the precursor of many peptides with biological activity. One of them is corticotrophin (ACTH). Under the influence of hypothalamic CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), POMC transcribed in corticotrophs cells is processed into ACTH. Thereafter, ACTH controls glucocorticoid synthesis by the adrenals. This feedback loop constitutes the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). Furthermore, the hypothalamus and the pituitary gland form a unit implicated in many regulatory axes that control a variety of physiological processes.

Different factors are involved in POMC gene transcription. Among them, the bHLH NeuroD1 and the orphan nuclear receptor Nur77 bind to their respective responses elements, the Ebox_{neuro} and the NurRE, in the distal portion of the POMC promoter. Since NeuroD1 is transiently expressed during pituitary development and that Nur77 is only active in presence of CRH, we generated transgenic mice expressing the reporter gene EGFP under the control of the intact POMC promoter and of POMC promoters mutated at the Ebox_{neuro} or at the NurRE. The data obtained have shed a new light on the dynamics of the POMC gene expression. Moreover, compared to previous studies done in cultured cells, the mutant mice allowed us to consider independently the *in vivo* importance for the Ebox_{neuro} and the NurRE in the developmental regulation of pituitary POMC gene expression.

Keywords: Transcription, Ebox_{neuro}, NurRE, NeuroD1, Nur77.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Tables des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Listes des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xv
 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	 1
1.1 Une des principales glandes endocrines : l'hypophyse.....	1
1.2 Relations entre l'hypophyse et l'hypothalamus.....	3
1.3 Histologie et types cellulaires.....	3
1.4 Hormones hypophysaires.....	4
1.4.1 Hormones adénohypophysaires.....	4
1.4.2 Hormones du lobe intermédiaire.....	8
1.4.3 Hormones neurohypophysaires.....	8
1.5 Développement et différenciation hypophysaire.....	9
1.5.1 Origine embryonnaire de l'hypophyse.....	9
1.5.2 Ontogénie des types cellulaires hypophysaires.....	10
1.5.3 Facteurs régulant le développement hypophysaire.....	10
1.5.3.1 Molécules de signalisation.....	13
1.5.3.2 Facteurs de transcription.....	18
1.6 Découverte de la pro-opiomélanocortine.....	25
1.6.1 Le gène POMC et son expression dans différents tissus.....	26
1.6.2 Maturation de POMC.....	28
1.6.3 Effets biologiques des peptides dérivés de la maturation de POMC.....	29
1.7 Mécanismes de transcription histo-spécifiques de POMC.....	31
1.7.1 Le promoteur POMC.....	31
1.7.2 Le facteur bHLH NeuroD1.....	34
1.7.3 Les facteurs Pitx (Ptx).....	35
1.7.4 Le facteur histo-spécifique Tpit.....	37

1.8 Régulation hormonale de l'expression de POMC.....	39
1.8.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et l'activation CRH....	39
1.8.2 La sous-famille de récepteurs nucléaires orphelins Nur.....	41
1.8.3 Signalisation LIF.....	43
1.8.4 Répression par les glucocorticoïdes.....	44
1.9 Hypothèses et objectifs de travail.....	46

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....48

2.1 Plasmides et oligonucléotides.....	48
2.2 Étude de retard sur gel (EMSA).....	49
2.3 Culture cellulaire et transfections.....	49
2.4 Souris transgéniques et géotypage.....	50
2.5 Production de l'anticorps NeuroD1.....	51
2.6 Préparation des tissus.....	51
2.7 Immunohistochimie et immunofluorescence.....	51
2.8 Extraction d'ARN et RT-PCR.....	52
2.9 Réactions de Q-PCR.....	52
2.10 Extraits totaux.....	53
2.11 Immunobuvardage de type Western (Western blot).....	53

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....54

3.1 Patrons d'expression des facteurs Nur77 et NeuroD1 au cours du développement hypophysaire.....	54
3.1.1 Patron d'expression de NeuroD1.....	54
3.1.2 Les membres de la famille Nur sont exprimés de façon ubiquitaire tout au long du développement hypophysaire.....	54
3.2 Production des mutations de perte de fonction pour les cibles NeuroD1 et Nur77.....	56
3.2.1 Les mutations de la boîte E _{neuro} et du NurRE abolissent la liaison de leurs facteurs.....	56
3.2.2 Les mutations n'entraînent pas d'interférence fonctionnelle entre les parties distale et centrale du promoteur POMC.....	58

3.3 Production des souris transgéniques et mise au point des paramètres nécessaires aux analyses qualitatives et quantitatives.....	60
3.3.1 L'expression EGFP au cours du développement est restreinte aux cellules POMC ⁺ chez les souris pPOMC-EGFP intact.....	60
3.3.2 Détection du signal EGFP par immunobuvardage de type Western.....	60
3.3.3 Détection et quantification du signal EGFP aux différents stades embryonnaires du développement hypophysaire.....	63
3.4 Analyses quantitative et qualitative de l'expression EGFP pour les lignées promoteurs boîte E _{neuro} mutée et NurRE muté.....	66
3.4.1 Production des lignées transgéniques stables pPOMC-EGFP boîte E _{neuro} mutée ou NurRE muté.....	66
3.4.2 Quantification de l'expression du transgène EGFP en protéine par le système Odyssey.....	66
3.4.3 Quantification par RT-QPCR de l'expression du transgène EGFP au cours du développement hypophysaire.....	68
3.4.4 Profils d'expression du transgène EGFP sous contrôle des promoteurs POMC intact, boîte E _{neuro} mutée ou NurRE muté.....	71
3.5 Conclusion.....	73
 CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	 74
4.1 Cinétique d'expression de NeuroD1 et Nur77.....	74
4.2 Analyses quantitative et qualitative de l'expression EGFP <i>in vivo</i> pour les lignées porteuses d'un promoteur POMC muté.....	75
4.3 Perspectives.....	79
 RÉFÉRENCES.....	 84

Liste des tableaux

Tableau I : Représentation du pourcentage moyen d'expression EGFP pour chaque lignée de chacun des transgènes chez l'adulte.....	69
--	----

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1.1 Situation anatomique et représentation schématique de l'hypophyse.....	2
Figure 1.2 L'axe hypothalamo-hypophysaire et ses organes cibles.....	5
Figure 1.3 Modèle de développement et de différenciation des différents types cellulaires hypophysaires.....	11
Figure 1.4 Représentation schématique du développement de l'hypophyse.....	12
Figure 1.5 Rôle de Prop-1 et de Pit-1 au cours du développement hypophysaire murin..	20
Figure 1.6 Modèle de différenciation des lignées somatotropes, lactotropes, gonadotropes et thyrotropes.....	22
Figure 1.7 Structure, maturation et expression du gène <i>POMC</i>	27
Figure 1.8 Représentation schématique du promoteur POMC, de ces éléments régulateurs et des facteurs de transcription apparentés.....	33

Chapitre 3 : Résultats

Figure 3.1: Cinétique d'expression pour NeuroD1 et Nurr1 au cours du développement hypophysaire.....	55
Figure 3.2: Étude de liaison pour NeuroD1 et Nur77 sur leurs éléments de réponse respectifs intact vs muté.....	57
Figure 3.3: Vérification de la spécificité des mutations en transfection.....	59
Figure 3.4: Construction des transgènes et représentation des fragments nécessaires à la micro-injection.....	61
Figure 3.5: L'expression EGFP au cours du développement hypophysaire est restreinte aux cellules POMC ⁺ chez les souris pPOMC-EGFP intact.....	62
Figure 3.6: Les niveaux d'expression du transgène EGFP permettent la détection par immunobuvardage de type Western.....	64
Figure 3.7: La détection et la quantification de la EGFP sont possibles aux différents stades embryonnaires du développement.....	65
Figure 3.8: Quantification de l'expression du transgène EGFP en protéine par le système Odyssey.....	67
Figure 3.9: Quantification par RT-QPCR de l'expression du transgène EGFP (pPOMC intact vs muté) au cours du développement hypophysaire.....	70

Figure 3.10: Profils d'expression au cours du développement hypophysaire du transgène EGFP (promoteur POMC intact vs muté), de POMC (ACTH) et colocalisation.....	72
---	----

Chapitre 4 : Discussion

Figure 4.1 Profils d'expression hypophysaire des bHLHs ayant un rôle redondant potentiel avec NeuroD1.....	81
--	----

Liste des sigles et abréviations

α -GSU : Sous-unité glycoprotéique α

α -MSH : Hormone mélanostimuline α

β -MSH: Hormone mélanostimuline β

γ -MSH: Hormone mélanostimuline γ

A

ACTH: Adrenocortical-stimulating hormone (corticotrophine)

ADH: Hormone antidiurétique

ADN ou DNA: Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

ANF: Peptide atrionuturétique

ANR: Calotte ectodermique (anterior neural ridge)

AP-1: Activator Protein 1

AR: Récepteur des androgènes

ARC: Noyau arqué de l'hypothalamus

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

B

bHLH: Hélice-boucle-hélice basique

BMP: Bone morphogenic protein

C

C-: Carboxy

CE: Central element

CLIP: Corticotropin-like intermediate lobe protein

COUP-TF: Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor

CREB: cAMP-response element binding protein

CRH: Corticotropin releasing hormone

CRHr-1/2 : Récepteur du CRH 1/2

CSP : Codon stop prématuré

CUTE: Corticotroph upstream transcription element

D

DBD: DNA binding domain

DE: Distal element

E

E: Jour embryonnaire (embryonic day)

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

Egr-1: Early growth response gene-1

ER: Récepteur des oestrogènes

Erk1/2: Extracellular signal-regulated kinase

F

FGF: Fibroblast growth factor

FSH: Follicle-stimulating hormone

G

Gc: Glucocorticoïde

GH: Growth hormone (hormone de croissance)

GHRH: Growth hormone releasing hormone

GHRHr: Growth hormone releasing hormone receptor

GR : Récepteur des glucocorticoïdes

GRE : Élément de réponse à GR (GR response element)

GST: Glutathione sépharose transférase

H

HD: Homéodomaine

HIP: Hedgehog inhibitory factor

HPA (axe): Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (hypothalamic-pituitary-adrenal)

I

IAD: Déficience isolée en ACTH (isolated ACTH deficiency)

IGF-I: insulin-like growth hormone I

IL-4 : Interleukine 4

IL-6: Interleukine 6

Isl: Islet 1

K

Kb : Kilopaire de bases

L

LA (ou AL) : Lobe antérieur

LH: Lutropine (luteinizing hormone)

Lhx: LIM homeobox

LI (ou IL): Lobe intermédiaire

LIF: Leukemia inhibitory factor

LP (ou PL): Lobe postérieur

M

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MBP: Maltose binding protein

MC(1,2,3,4 ou 5)R: Récepteurs des mélanocortine (Melanocortine receptor)

MR: Récepteur des minéralocorticoïdes

N

N-: Amino

NBRE: NGFI-B response element

NGFI-B: Nerve Growth Factor Inducible-clone B

nGRE: Élément de réponse négative à GR (Negative GR Response Element)

NMD: Nonsense-mediated decay

NOR-1: Neuron-derived orphan receptor

nt: Nucléotide

Nurr1: Nur-related factor 1

NurRE : Élément de réponse à aux facteurs Nur (Nur Response Element)

P

Pax: Paired-box

pb : Paire de base

PC: Prohormone convertase

PCR : Polymerase chain reaction

PE: Proximal element

Pitx1/2: Pituitary homeobox 1/2

PKA: Protéine kinase A

POMC: Pro-opiomélanocortine

pPOMC-EGFP : Promoteur POMC en fusion avec le gène rapporteur EGFP

PP1: Putative pituitary POMC 1

PPAR: Proliferating peroxisome activating receptor

PR: Récepteur de la progestérone

PRL: Prolactine

Prop-1: Prophet of Pit-1

R

RAR: Récepteur à l'acide rétinoïque tout-trans

Rpx: Rathke's pouch homeobox

RSV: Rous sarcoma virus

RT : Transcriptase inverse

RXR: Récepteur de l'acide 9cis-rétinoïque

S

SF-1: Steroidogenic factor 1

Shh: Sonic hedgehog

SRC: Steroid receptor coactivator

SV40: Simian Virus 40

T

T: tail

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine

Tbx: T-box factor

TR: Récepteur de l'hormone thyroïdienne

TRH: Thyrotropin releasing hormone

TRHr : Thyrotropine releasing hormone receptor

TSH: Thyrotropine (thyroid-stimulating hormone)

Remerciements

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Jacques Drouin, pour ces trois années passées au sein de son laboratoire de même que pour sa compréhension par rapport à ma réorientation de carrière. Je tiens notamment à remercier mon codirecteur, Aurélio Balsalobre, pour son aide plus que précieuse, ses conseils et sa disponibilité. Grâce à lui, je vais toujours me rappeler que le DBD de Nur77 possède 2 états de phosphorylation!

Je remercie également tous mes camarades du labo, sans oublier les étudiants du laboratoire de Mona Nemer, qui m'ont fait apprécier davantage les dernières années. Je désire porter une attention spéciale à Lionel Budry qui a permis l'avancement des travaux lorsqu'il m'était impossible d'être présent. De plus, je salue les gens des divers services de l'IRCM qui ont contribué à la réalisation du projet, c'est-à-dire Michel Robillard à la transgénèse, Annie Vallée à l'histologie, Jacques Lavigne au séquençage ainsi que Julie D'amour en santé animal.

Je désire souligner l'assiduité de mes amis tout au long de mon périple, en particulier de la part de mon colocataire et meilleur ami, André Bathalon (Tquiero). Ils ont su me remonter le moral et me faire oublier mes problèmes. Évidemment, je tiens à dire un gros merci à mes parents pour leur support continu et leur dévouement à mon égard. Je leur dois toute ma réussite et leur témoigne mon appréciation la plus sincère.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Une des principales glandes endocrines : l'hypophyse

L'hypophyse, autrefois appelée glande pituitaire, est située dans la selle turcique de l'os sphénoïde et sécrète six hormones majeures. Elle se trouve suspendue à une tige en forme d'entonnoir, l'infundibulum, qui relie l'hypophyse à la partie inférieure de l'hypothalamus. La méninge supérieure, la dure-mère, tapisse les parois osseuses et ferme la loge hypophysaire en constituant le diaphragme sellaire. De cette façon, l'entrée de la membrane arachnoïde et du liquide cérébro-spinal dans la selle turcique est évitée. L'infundibulum et ses vaisseaux sanguins passent à travers une ouverture au sein de ce diaphragme. Les murs latéraux de la glande sont en apposition directe avec le sinus caverneux. Chez l'homme, le chiasma optique se trouve 5 à 10 mm au-dessus du diaphragme sellaire et antérieurement à l'infundibulum (figure 1.1). Elle mesure approximativement 15 X 10 X 6 mm et pèse de 500 à 900 mg. Cependant, sa taille peut doubler pendant la grossesse (1).

Chez l'être humain adulte, l'hypophyse comprend deux lobes, l'un formé de tissu nerveux (le lobe postérieur) et l'autre, de tissu glandulaire (le lobe antérieur) (2). La neurohypophyse, ou lobe postérieur, libère des neurohormones qu'elle reçoit, préfabriquées, de l'hypothalamus. Par conséquent, la neurohypophyse est davantage un site d'entreposage qu'une glande endocrine. À l'opposé, le lobe antérieur, l'adénohypophyse, est composé de cellules hormonopoïétiques qui produisent et libèrent plusieurs hormones. De plus, un troisième lobe, le lobe intermédiaire, est présent chez la plupart des vertébrés et est particulièrement développé chez les rongeurs. Dans le cas de l'être humain, cette structure est présente au cours de l'embryogenèse, mais régresse pour ensuite disparaître à l'âge adulte (3).

Le sang artériel est acheminé à l'hypophyse par des ramifications de l'artère carotide interne. Quelques artères hypophysaires supérieures desservent l'adénohypophyse et l'infundibulum, tandis que deux artères hypophysaires inférieures, une de chaque côté, irriguent la neurohypophyse. Les veines sortant de l'hypophyse se jettent dans le sinus caverneux et dans d'autres sinus de la dure-mère situés à proximité (1).

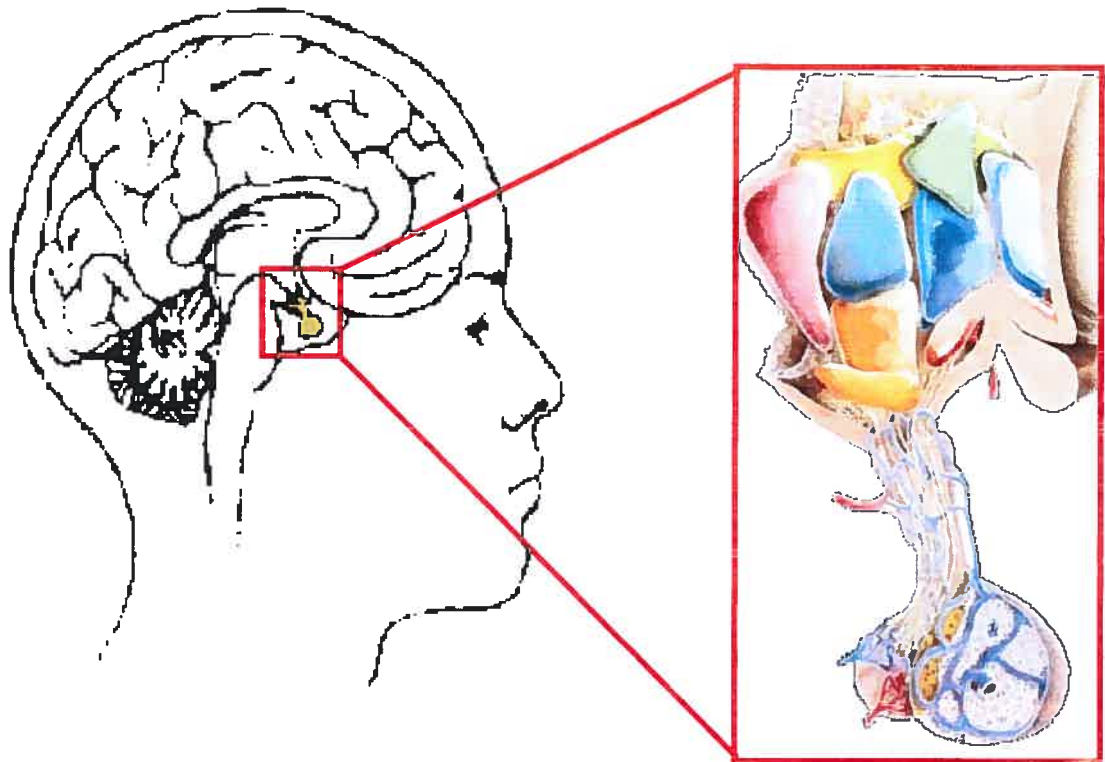


Figure 1.1: Situation anatomique et représentation schématique de l'hypophyse chez l'humain. L'hypophyse est reliée à l'hypothalamus via l'infundibulum.

1.2 Relations entre l'hypophyse et l'hypothalamus

L'hypophyse humaine adulte possède deux origines distinctes. La neurohypophyse se forme à partir d'une excroissance du tissu hypothalamique (nerveux) et elle reste unie à l'hypothalamus par les neurofibres du tractus hypothalamo-hypophysaire qui passe dans l'infundibulum (4). D'un autre côté, le lobe antérieur dérive du tissu épithélial et provient d'une invagination de la partie supérieure de la muqueuse orale (le diverticule ou poche de Rathke, décrit en détail plus loin) (2). Durant tout le développement, un contact constant est maintenu entre l'adénohypophyse en formation et l'infundibulum qui deviendra plus tard la neurohypophyse. Les deux lobes forment l'hypophyse adulte. La connexion entre l'adénohypophyse et l'hypothalamus est de nature vasculaire plutôt que nerveuse. En effet, il existe deux réseaux de capillaires : un primaire au niveau de l'infundibulum et un secondaire dans l'adénohypophyse. La communication entre ces deux réseaux capillaires se fait via de minuscules veines portes hypophysaires, formant ainsi le système porte hypothalamo-hypophysaire. Les hormones de libération et d'inhibition en provenance de l'hypothalamus ventral vont atteindre l'adénohypophyse par l'intermédiaire de ce système porte afin d'y contrôler l'activité sécrétrice des cellules hormonopoïétiques cibles (5).

1.3 Histologie et types cellulaires

Les cellules de l'hypophyse antérieure ont été originellement classifiées comme étant acidophiles, basophiles et chromophobes. Les techniques d'immunohistochimie et de microscopie électronique permettent maintenant la classification de ces cellules par leurs produits de sécrétion. Nous y retrouvons cinq types cellulaires sécrétant six hormones majeures: les somatotropes qui produisent l'hormone de croissance (GH), les corticotropes qui sécrètent la corticotrophine (ACTH), les lactotropes qui synthétisent la prolactine (PRL), les thyrotropes qui produisent la thyrotrophine (TSH) et les gonadotropes qui sécrètent l'hormone folliculostimulante (FSH) et lutéinisante (LH) (6). En terme de proportion, les somatotropes comptent pour environ 50% de l'adénohypophyse, les corticotropes représentent 10 à 15%, tandis que chacun des autres types cellulaires compte pour moins de 10%. Cependant, cette distribution peut varier beaucoup, puisque les lactotropes prolifèrent pendant la grossesse suite à l'élévation du niveau d'œstrogène. Cette prolifération leur permet d'atteindre les 25%.

Le lobe intermédiaire est composé de cellules endocrines, les mélanotropes, qui expriment l'hormone mélanotrope (MSH). Cependant, comme mentionné plus haut, ce lobe n'est plus présent chez l'être humain adulte, mais reste développé chez d'autres animaux comme les rongeurs.

Le lobe postérieur est majoritairement composé de pituicytes (un type de gliocytes) et de neurofibres. Étant d'origine neuronale, les prolongements axonaux qui le composent naissent de neurones situés dans les territoires magnocellulaires des noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus. Les neurones paraventriculaires et supraoptiques synthétisent respectivement l'ocytocine et l'hormone antidiurétique (ADH), aussi appelée vasopressine.

1.4 Hormones hypophysaires

En plus de la régulation des axes endocriniens, les hormones hypophysaires sont essentielles aux fonctions métaboliques de différents organes cibles comme les reins, l'utérus et les glandes mammaires. La partie suivante dresse une liste des principales hormones sécrétées par chacun des lobes de l'hypophyse.

1.4.1 Hormones adénohypophysaires

L'adénohypophyse élabore de nombreuses hormones dont plusieurs régissent l'activité d'autres glandes endocrines. Néanmoins, on connaît six hormones adénohypophysaires ayant chacune des effets physiologiques distincts sur l'être humain (figure 1.2). Lorsque l'adénohypophyse reçoit un stimulus chimique adéquat de l'hypothalamus, certaines de ses cellules libèrent une hormone ou plus. Les messagers qui parviennent à l'adénohypophyse depuis l'hypothalamus vont exercer leurs actions physiologiques suite à la liaison de leurs récepteurs spécifiques situés au niveau de leurs cellules cibles. Ces dernières vont ensuite synthétiser et sécréter des hormones en réponse à ces messagers hypothalamiques. En revanche, les signaux inhibiteurs en provenance de l'hypothalamus entraînent plutôt l'arrêt de l'activité sécrétoire des cellules adénohypophysaires cibles.

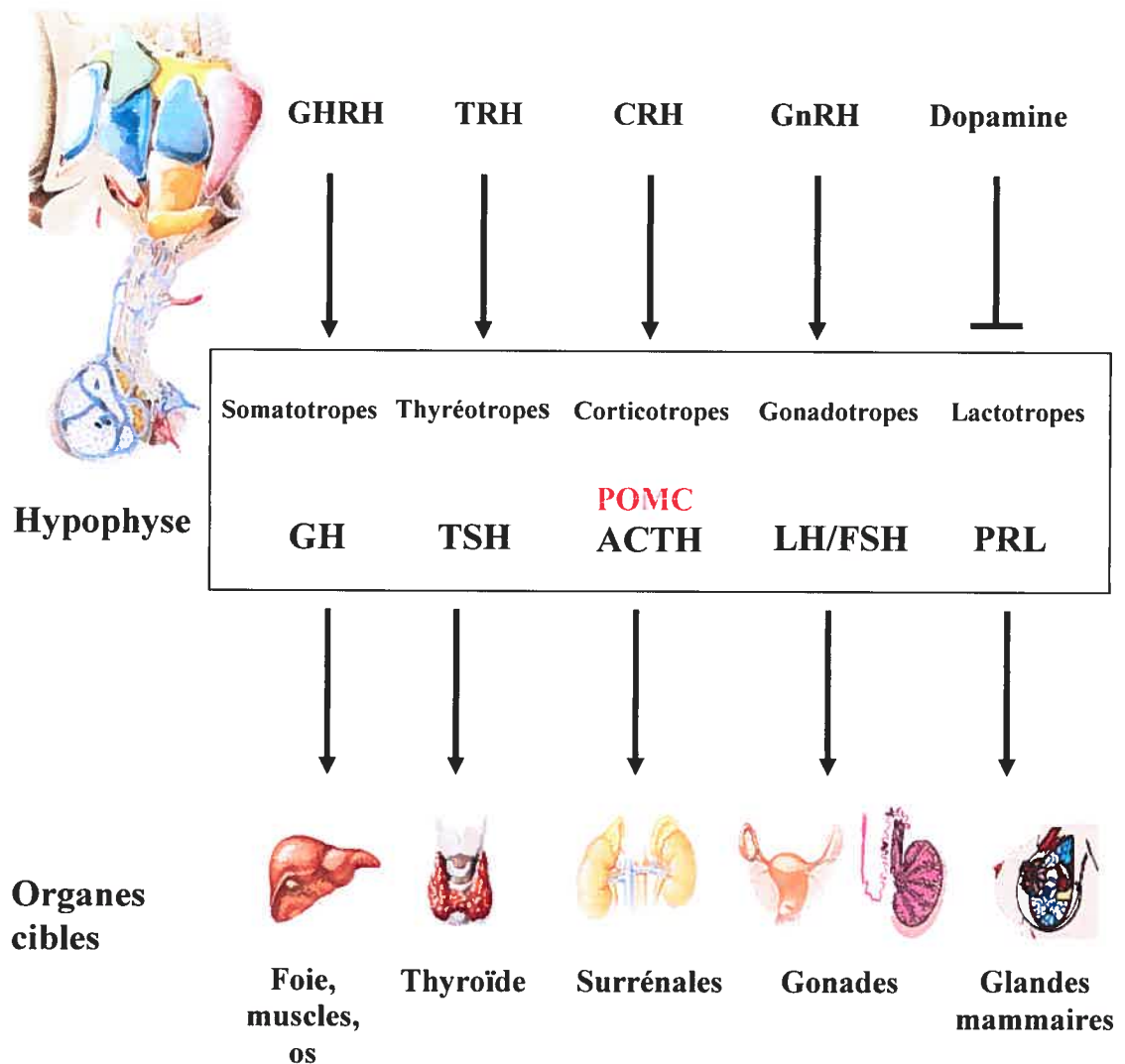


Figure 1.2: L'axe hypothalamo-hypophysaire et ses organes cibles. Issues de l'hypothalamus, de nombreuses hormones de libération ou d'inhibition atteignent l'adénohypophyse. Lorsque celle-ci reçoit un stimulus chimique adéquat de l'hypothalamus, certaines de ses cellules libèrent à leur tour une hormone ou plus qui joueront différents rôles physiologiques une fois en contact avec leur(s) organe(s) effecteur(s).

Quatre des six hormones adénohypophysaires, la thyroïdostimuline (TSH), la corticotrophine (ACTH), l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) sont des stimulines, c'est-à-dire qu'elles activent la sécrétion hormonale d'autres glandes endocrines. Les deux autres hormones adénohypophysaires, l'hormone de croissance (GH) et la prolactine (PRL) agissent principalement sur des cibles non endocriniennes. Toutes les hormones adénohypophysaires agissent par l'intermédiaire d'un second messager, l'AMP cyclique.

Hormone de croissance (GH) : L'hormone de croissance (GH, Growth Hormone), aussi appelé somatotrophine, est un polypeptide de 191 acides aminés sécrété par les cellules somatotropes. Comme son nom l'indique, la GH stimule la croissance et la division de la plupart des cellules de l'organisme. Sur l'os, la GH entraîne la prolifération des chondroblastes du cartilage épiphysaire permettant ainsi la croissance des os longs jusqu'à l'adolescence. Étant de nature anabolisante, l'hormone de croissance favorise également la synthèse de protéines et l'accroissement de la masse musculaire. Aussi, elle possède un effet diabétogène sur l'organisme, c'est-à-dire qu'elle augmente la glycémie en facilitant la conversion des triglycérides en acides gras. Les effets de cette hormone sur la croissance font intervenir une classe de protéines, les somatomédines, aussi appelées facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF, Insulin-like Growth Factor). Ces protéines sont produites par le foie, les muscles et d'autres tissus. De plus, deux hormones hypothalamiques aux effets antagonistes régissent la sécrétion de l'hormone de croissance par l'hypophyse. La somatocrinine (GHRH, Growth Hormone-Releasing Hormone) provoque la libération de GH, tandis que la somatostatine (GHIH, Growth Hormone-Inhibiting Hormone) l'inhibe (5).

Prolactine (PRL) : La prolactine (PRL) est composée de 199 acides aminés et présente une homologie de séquence avec l'hormone de croissance. Sous l'influence d'hormones hypothalamiques stimulantes, les cellules lactotropes de l'hypophyse sont amenées à produire et libérer la prolactine. À ce propos, le PRF (Prolactin-Releasing Factor) en provenance de l'hypothalamus favorise la synthèse et la libération de prolactine, tandis que la dopamine, appelée PIF (Prolactin-Inhibiting Factor) dans cette

situation, possède des effets inhibiteurs sur les lactotropes. L'effet principal de la prolactine chez l'humain est la stimulation de la lactation (5).

Thyréotrophine (TSH): Tout comme les gonadotrophines FSH et LH (décrites plus bas), la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) est une glycoprotéine composée de deux chaînes polypeptidiques, les sous-unités α et β . La TSH partage la sous-unité α (α -GSU : α -Glycoprotein Sub-Unit) avec les gonadotrophines, tandis que la sous-unité β détermine la spécificité d'action de chacune de ces hormones. Suite à la libération d'un peptide hypothalamique appelé thyroïolibérine, les cellules thyroïotropes de l'adénohypophyse libèrent la thyroïotrophine (TSH). La TSH atteint ensuite la glande thyroïde où elle permet la synthèse et la relâche des hormones thyroïdiennes, la thyroxine (T_4) et la triiodothyronine (T_3). Ces dernières possèdent des effets biologiques sur la plupart des tissus de l'organisme. De plus, l'élévation des concentrations plasmatiques de T_4 et T_3 entraîne un arrêt de la sécrétion de thyroïolibérine et de thyroïotrophine par l'hypothalamus et l'hypophyse respectivement via un mécanisme de rétro-inhibition (5).

Gonadotrophines (FSH et LH): Les gonadotrophines sont l'hormone folliculostimulante (FSH, Follicle-Stimulating Hormone) et l'hormone lutéinisante (LH, Luteinizing Hormone); elles régissent le fonctionnement des gonades. Ces hormones sont libérées par les cellules gonadotropes de l'hypophyse en réponse à la gonadolibérine (GnRH, Gonadotropin-Releasing Hormone) que produit l'hypothalamus. Chez les deux sexes, la FSH stimule la production des gamètes (spermatozoïde et ovule), tandis que la LH favorise la production des hormones gonadiques. Chez la femme, la maturation du follicule ovarien est possible par l'action synergique de la FSH et de la LH jusqu'à la moitié du cycle menstruel. À ce moment, l'élévation de la concentration en oestrogènes permet la libération d'une grande quantité de LH par l'adénohypophyse, provoquant ainsi l'ovulation. La LH stimule également la synthèse et la libération des hormones ovariennes, les œstrogènes et la progestérone. Chez l'homme, la LH entraîne la production et la sécrétion de la testostérone par les cellules interstitielles (cellules de Leydig) des testicules (5).

Corticotrophine (ACTH) : La corticotrophine (ACTH, Adrenocorticotropic Hormone), ou hormone corticotrope, est sécrétée par les cellules corticotropes de l'adénohypophyse suite à la maturation du précurseur, la pro-opiomélanocortine (POMC) (décrite en détail plus loin). Elle amène le cortex surrénal à libérer les hormones corticostéroïdes et plus particulièrement les hormones glucocorticoïdes (Gc) qui aident l'organisme à résister aux facteurs de stress. La libération de la corticotrophine est provoquée par la corticolibérine (CRH, Corticotropin-Releasing Hormone) hypothalamique. L'élévation de la concentration de glucocorticoïdes exerce une rétro-inhibition sur la sécrétion de CRH par l'hypothalamus et d'ACTH par l'adénohypophyse (7).

1.4.2 Hormones du lobe intermédiaire

Le lobe intermédiaire n'est composé que d'un seul type de cellules endocrines, les mélanotropes. Celles-ci produisent et sécrètent les hormones mélanotropes, c'est-à-dire l' α -, la β - et la γ -MSH (Melanocyte-Stimulating Hormone). Ces hormones proviennent toutes d'un précurseur commun, la POMC. L' α -MSH accroît la synthèse de mélanine dans les mélanocytes des amphibiens, des reptiles et d'autres animaux pour y jouer un rôle important dans la pigmentation de la peau. Cependant, chez l'humain, la concentration plasmatique d' α -MSH est insignifiante. Cette substance y jouerait plutôt un rôle à titre de neurotransmetteur au niveau du système nerveux central. La pigmentation dans ce cas serait régulée par l' α -MSH produite localement par les mélanocytes (8). Du reste, la libération de l' α -MSH est inhibée par les neurones hypothalamiques libérant de la dopamine.

1.4.3 Hormones neurohypophysaires

Le système hypothalamo-neurohypophysaire sécrète deux nonapeptides basiques : l'hormone antidiurétique (ADH ou vasopressine) et l'ocytocine. L'ADH est un important régulateur de l'équilibre hydrique, mais il agit aussi comme un puissant vasoconstricteur et joue un rôle dans la régulation de la fonction cardiovasculaire. L'ocytocine stimule la contraction du muscle lisse de l'utérus lors de l'accouchement de même que celle des cellules myoépithéliales des glandes mammaires, causant ainsi l'éjection du lait maternel (5).

Synthétisés par des types cellulaires différents, l'ADH et l'ocytocine sont issues de prohormones qui contiennent le peptide hormonal de même qu'un peptide de liaison spécifique pour l'hormone. Ce peptide associé, appelé neurophysine, joue un rôle de transporteur. En effet, il accompagne l'hormone dans les vésicules de sécrétion jusqu'aux terminaisons axonales du lobe postérieur. À ce niveau, une maturation finale produit le nonapeptide mature et sa neurophysine associée. Lorsque les neurones hypothalamiques produisent des potentiels d'action, ces peptides jusqu'à présent emmagasinés dans le lobe postérieur, seront co-sécrétés en quantité équimolaire par exocytose dans le liquide interstitiel, à proximité d'un lit capillaire pour être ensuite distribués dans l'organisme (1).

1.5 Développement et différenciation hypophysaire

Pendant le développement de l'hypophyse des mammifères, plusieurs types cellulaires distincts émergent depuis un précurseur commun. L'apparition de types cellulaires spécifiques survient en réponse à des gradients de signalisation qui s'opposent l'un à l'autre et qui sont eux-mêmes d'origines distinctes. Ces signaux vont induire l'expression de régulateurs transcriptionnels qui permettront de façon synergique une régulation spatio-temporelle de la prolifération et de l'induction de différents types cellulaires. En ce qui concerne POMC, plusieurs facteurs régulant sa transcription sont présents tôt au cours du développement et certains d'entre eux sont aussi impliqués dans le développement de l'hypophyse. Je vais donc poursuivre avec une revue des mécanismes régulateurs, des molécules de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans le développement précoce hypophysaire murin. Leur rôle dans l'ontogénie corticotrope sera davantage considéré.

1.5.1 Origine embryonnaire de l'hypophyse

L'hypophyse est initialement dérivée d'une région contiguë à la crête neurale antérieure se situant dans la portion la plus antérieure de la ligne médiane de l'embryon (9-11). La crête neurale antérieure est déplacée ventralement pour former l'épithélium oral qui donnera les structures du haut de l'intérieur de la bouche. L'hypophyse se développe ensuite à partir d'une région de l'ectoderme oral, ou stomodeum, qui est en contact avec le neuroectoderme destiné à devenir le diencéphale ventral (12-14).

L'ectoderme oral et le diencéphale ventral se séparent l'un de l'autre sur toute la surface ventrale du cerveau en développement, excepté au niveau du primordium hypophysaire où un contact est maintenu entre les deux tissus. À ce point d'ancrage, l'hypophyse rudimentaire, appelée poche de Rathke, prend l'apparence d'une invagination vers le dixième jour du développement (E10) (2). Parallèlement à l'invagination de l'ectoderme oral, une portion du diencéphale ventral (l'infundibulum) faisant un contact direct avec la partie dorsale de la poche de Rathke prend l'apparence d'une évagination. Cette ébauche d'origine neuroectodermale formera plus tard la neurohypophyse (2).

1.5.2 Ontogénie des types cellulaires hypophysaires

Bien que l' α -GSU soit détectable au jour E11.5 du développement, les corticotropes sont les premières cellules endocrines de l'hypophyse à atteindre la différenciation terminale. L'ARNm de POMC apparaît dans ces cellules (ACTH) au jour E12.5 dans le lobe antérieur de l'hypophyse murine et vers E14.5 dans les mélanotropes (α -MSH) du lobe intermédiaire. La TSH β est retrouvée au sein d'une population de thyrotropes transitoires dès E12.5 (15). Par contre, ces cellules disparaissent après la naissance. Dans le lobe antérieur, l'ARNm de la TSH- β est cependant détecté dans les thyrotropes matures à partir de E14.5, suivi par l'expression de l'ARNm de la GH et de la PRL dans les somatolactotropes à partir de E16.5. Finalement, les transcrits de la LH β et de la FSH β apparaissent à E16.5 et E17.5 respectivement (16) (figure 1.3).

1.5.3 Facteurs régulant le développement hypophysaire

Le développement hypophysaire est contrôlé par une combinaison séquentielle de signaux exogènes et endogènes. L'atténuation subséquente de signaux spécifiques permet ensuite la différenciation terminale. Ces signaux sont composés de molécules de signalisation, appelées morphogènes, qui régissent la détermination positionnelle ainsi que la prolifération cellulaire. À travers leurs gradients d'expression, ils régulent l'apparition de facteurs de transcription spécifiques qui contrôleront la différenciation. Dans les prochains paragraphes, je décrirai donc les principaux morphogènes et facteurs qui influencent le développement hypophysaire (figure 1.4).

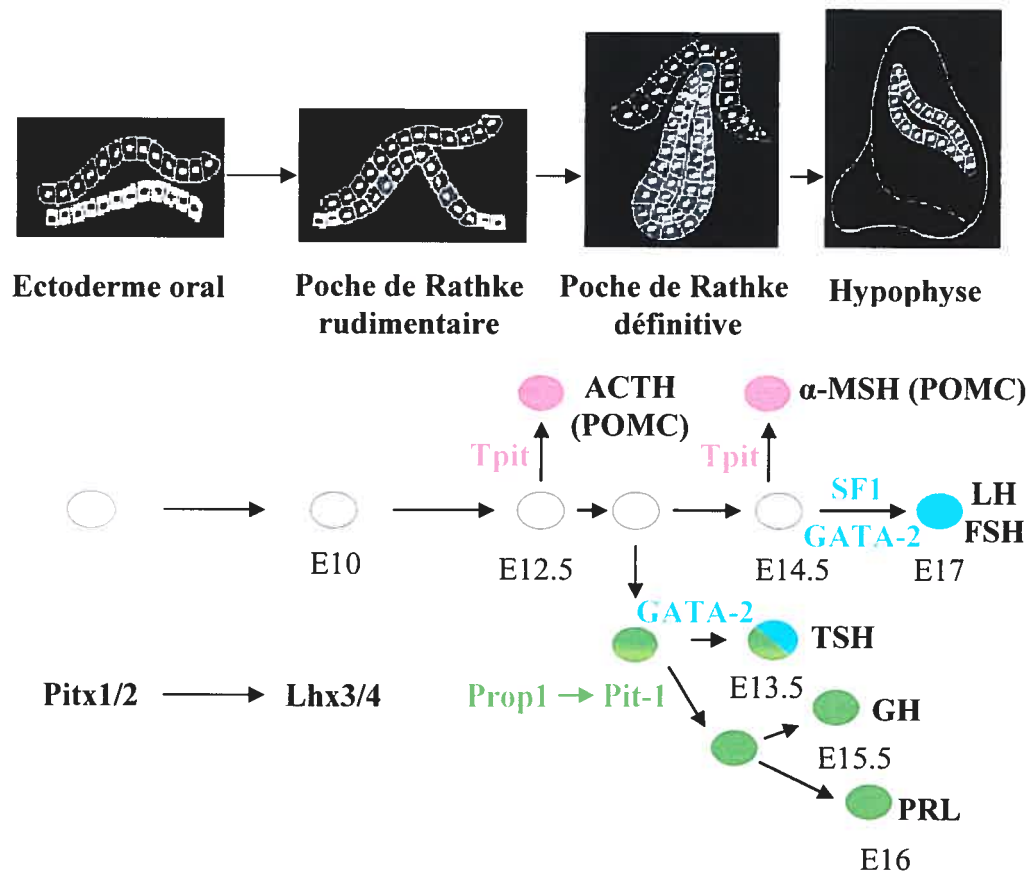


Figure 1.3: Modèle de développement et de différenciation des différents types cellulaires hypophysaires. Les étapes du développement hypophysaire au haut de la figure coïncident avec l'ordre chronologique temporel d'apparition des marqueurs de différenciation terminale hypophysaires. Les hormones sécrétées par chacun des types cellulaires sont représentées.

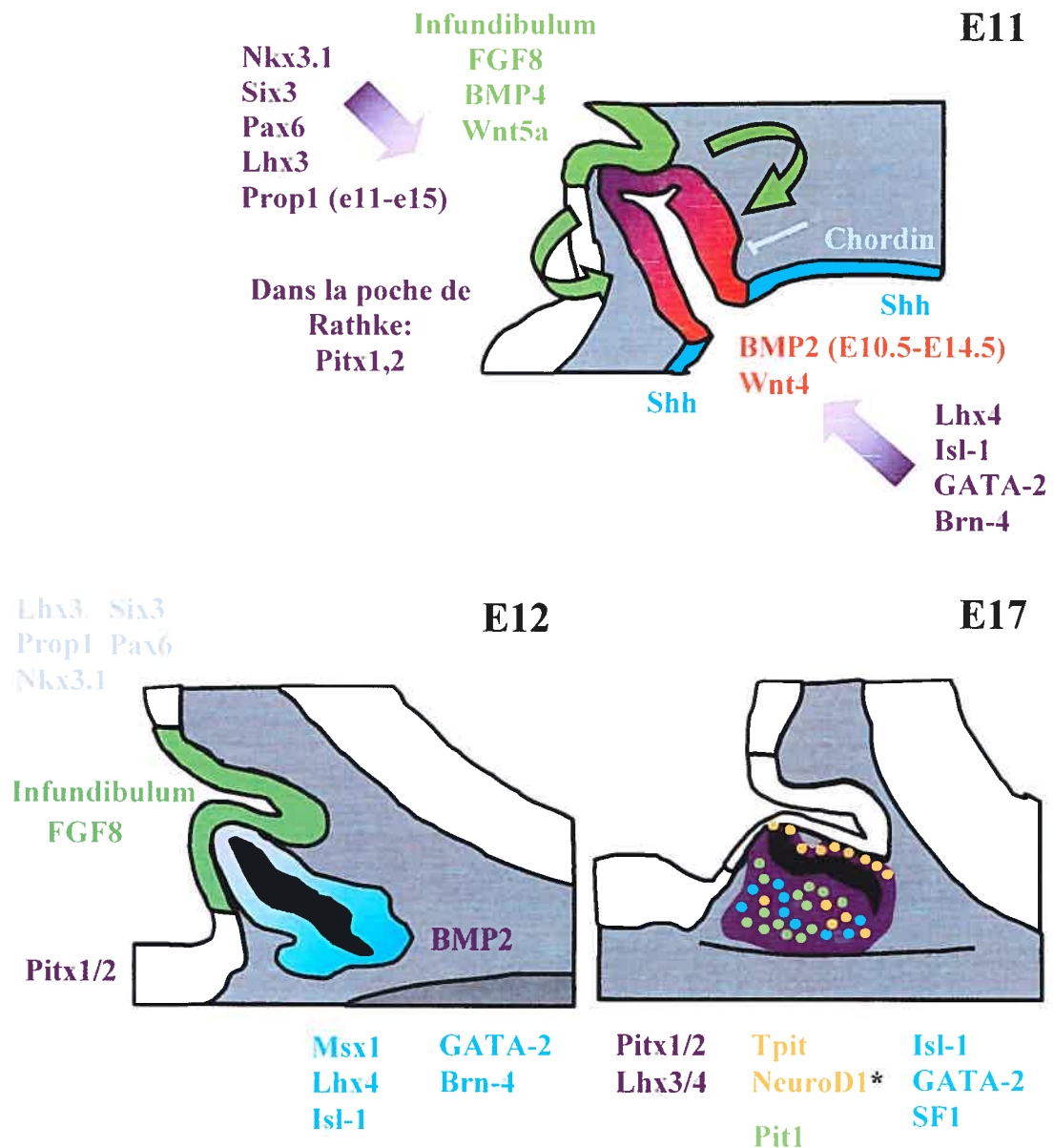


Figure 1.4: Représentation schématique du développement de l'hypophyse. Les morphogènes, molécules de signalisation (extrinsèques et intrinsèques) et facteurs de transcription impliqués dans le développement hypophysaire sont représentés dans leur ordre chronologique d'apparition. Le code couleur indique le lieu d'expression pour chacun. Les flèches de chaque côté de la glande en développement (à E11) indiquent la présence de gradients d'expression pour les différents facteurs impliqués.

* NeuroD1 est exprimé dans les corticotropes, tandis que Tpit est exprimé au sein des deux types cellulaires exprimant la POMC ; les mélanotropes (lobe intermédiaire) et les corticotropes (lobe antérieur).

1.5.3.1 Molécules de signalisation

Signaux extrinsèques: Les signaux extrinsèques se retrouvent sous plusieurs formes de morphogènes sécrétées et agissent entre autre par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires. Les cascades de signalisation subséquentes généreront des environnements locaux qui permettront la détermination positionnelle des types cellulaires progéniteurs et orchestrera la morphologie des organes par l'induction d'évènements prolifératif ou apoptotique spécifiques (2). La phase initiale de signalisation extrinsèque du développement hypophysaire murin requiert des signaux émanant du diencéphale ventral et de l'ectoderme oral. Le principal signal connu provenant de l'ectoderme oral est Sonic hedgehog (Shh) (17). D'un autre côté, les signaux provenant du diencéphale ventral comprennent les BMPs (Bone Morphogenetic Protein), les FGFs (Fibroblast Growth Factor), et les membres de la famille Wnt. L'apparition de ces facteurs coïncide avec le développement initial de la poche de Rathke. Leur expression s'atténue différenciellement au fur et à mesure que les lignées cellulaires émergent (15;17;18). Des expériences de recombinaison tissulaires ont d'ailleurs démontré que le neuroectoderme est une source de signaux inductifs pour la prolifération et l'expansion du primordium hypophysaire (19), suggérant donc que l'infundibulum agit comme un centre d'organisation. Cette observation est venue de l'analyse de souris ayant subis l'ablation du gène codant pour la protéine à homéodomaine *T/ebp* (*Nkx2.1*) qui est exprimée entre autre dans le diencéphale ventral, mais exclue de la poche de Rathke. Chez ces souris, des régions ventrales du cerveau, dont l'infundibulum, sont manquantes. De pair avec le rôle critique de l'infundibulum dans l'organogenèse de l'hypophyse, les trois lobes de la glande sont absents dans la souris déléetée du gène *T/ebp* (18).

Sonic hedgehog (Shh) est exprimé au sein de plusieurs centres d'organisation au cours de l'embryogenèse, où il exerce des rôles morphologiques cruciaux (20). Shh est l'homologue vertébré de Hedgehog (Hh), une protéine de sécrétion jouant un rôle important dans la définition des frontières entre les compartiments antérieur et postérieur du disque imaginal (21) chez la *Drosophile*. Pendant le développement précoce hypophysaire, Shh est exprimé dans l'ensemble de l'ectoderme oral à partir de E8, mais il est exclu de la poche de Rathke en invagination (6).

Le rôle de la signalisation Shh fut testée par l'expression ectopique d'un antagoniste de la signalisation Hedgehog, Hip (Hedgehog interacting protein), en utilisant les éléments régulateurs de *Pitx1* spécifiques pour l'ectoderme oral et la poche de Rathke (22). Un arrêt du développement hypophysaire suite à la formation de la poche rudimentaire fut observé (22). Ainsi, Shh est requis pour la prolifération de l'hypophyse après E10 (6). POMC, normalement détectable dans l'hypophyse à E12.5 (23), est absent des glandes transgéniques E13 *Pitx1*-Hip. En accord avec le phénotype obtenu chez les embryons *Shh*^{-/-} (22), ces résultats suggèrent un rôle pour Shh dans l'initiation du développement de la poche de Rathke et conséquemment, dans la différenciation des corticotropes. Il est cependant douteux que la différenciation corticotrope soit directement induite par Shh, puisque des hypophyses transgéniques α -GSU-Shh ne montrent aucune augmentation du nombre de corticotropes (22).

L'importance de la signalisation Hedgehog dans la spécialisation des types cellulaires hypophysaires est venue d'études génétiques chez le poisson zèbre. Le mutant *you-too* (*yot*), fut originellement caractérisé par des défauts du chiasma optique et du développement des somites (2). Plus récemment, des défauts de développement hypophysaire furent observés chez ce mutant (22). Cependant, le clonage positionnel du locus *yot* identifia le gène défectueux comme étant l'homologue chez le poisson zèbre de la protéine à doigts de zinc Gli2 mammifère (24). Les facteurs de transcription de la famille Gli sont reconnus comme étant des médiateurs en aval de la signalisation Hedgehog (25). Dans ces mutants *yot*, les domaines d'expression rostraux (analogues aux domaines ventraux chez la souris) de facteurs de transcription spécifiques de l'hypophyse comme *lim3* (*Lhx3*), *six3* et *nk2.2* (*Nkx2.2*) sont perdus (2;22). Par ailleurs, Shh est requis, en agissant de concert avec les FGFs (15), pour soutenir l'expression ventrale de *Lhx3* (22;26;27). Réciproquement, la surexpression de Shh entraîne l'hyperprolifération des types cellulaires ventraux gonadotropes et thyroïdotes (22). De plus, connaissant les rôles séquentiels et coopératifs que les BMPs et les Hedgehogs exercent dans le développement des membres et du tube neural (28;29), où Shh induit l'expression des BMPs, Shh pourrait agir en cascade avec le signal intrinsèque BMP2 (qui sera décrit en détail plus loin) dans la détermination des lignées cellulaires hypophysaires ventrales.

Les BMPs ont été montrés comme ayant des rôles critiques dans la morphologie et la spécification de types cellulaires de plusieurs espèces (30). Plus particulièrement, le rôle de BMP-4 dans la signalisation contrôlant l'organogenèse de l'hypophyse a été investigué *in vivo* par l'expression spécifique de Noggin, un antagoniste des BMP-2 et -4, en souris transgéniques. Sous le contrôle de la séquence promotrice du gène *Pitx*, Noggin fut exprimé spécifiquement dans la poche de Rathke et l'ectoderme oral. Ces souris transgéniques montrèrent un arrêt du développement hypophysaire suite à l'apparition de la poche rudimentaire, c'est-à-dire aux alentours de E10, de même qu'une absence complète de tous les types cellulaires endocriniens qui la composent en temps normal (17). De plus, le rôle des BMPs dans le développement précoce hypophysaire a aussi été vérifié chez des animaux ayant subi l'ablation du gène *BMP-4*. Le phénotype résultant fut un manque complet de formation de la poche rudimentaire avec un diencephale ventral apparemment intact (31). La signalisation BMP-4 apparaît donc comme étant requise pour la phase initiale d'induction de la formation de l'hypophyse. Cependant, la pertinence de la signalisation BMP-4 précoce sur les cellules corticotropes embryonnaires en voie de spécification n'est pas claire. En effet, l'expression d'ACTH (issu de la maturation de POMC) fut diminuée dans des explants de poches de Rathke (E9.5) cultivés *ex vivo* en présence de billes enrobées de BMPs (15). Par contre, la différenciation des corticotropes n'apparaît pas affectée au sein d'embryons transgéniques exprimant Noggin sous contrôle du promoteur *Pitx1* (17). Ainsi, les effets de BMP-4 sur la différenciation corticotrope pourraient dépendre des niveaux et/ou du moment d'expression de BMP-4 (16).

En plus de BMP-4, plusieurs membres de la famille des FGFs sont exprimés dans l'infundibulum et ont été démontrés comme ayant des rôles critiques au niveau de la morphologie et de la détermination positionnelle des lignées cellulaires hypophysaires. Suite à l'induction de BMP-4, FGF-8 et FGF-10 sont exprimés tout au long du développement hypophysaire, de façon spatio-temporelle semblable, à l'intérieur de l'infundibulum (2). Le rôle de FGF-8 fut évalué *in vitro* par la co-culture d'explants de même qu'*in vivo* par transgénèse et production d'animaux ayant subi l'ablation génique. Dans les essais de culture de poche de Rathke en présence de diencephale ventral, l'infundibulum fut montré comme étant requis et suffisant pour l'induction de

l'expression du gène *Lhx3/P-Lim*. Ce gène code pour une protéine à homéodomaine LIM qui est critique pour la progression du développement hypophysaire au-delà de l'invagination ainsi que pour la détermination de la plupart des types cellulaires de l'hypophyse (32). De plus, en absence de l'infundibulum, l'expression de *Lhx3* à l'intérieur de la poche peut être induite lorsque celle-ci est co-cultivée avec des billes enrobées de FGF-8 ou de FGF-2 (15), suggérant ainsi que les FGFs miment l'habilité que possède l'infundibulum à maintenir l'expression du gène *Lhx3*. Comme l'infundibulum n'exprime pas FGF-2 (15), son activité de signalisation passe probablement par FGF-8. En ce qui concerne l'expression de POMC, Edlund et ses collègues ont montré que l'expression d'ACTH était diminuée à l'intérieur d'explants de poche de Rathke mis en présence d'infundibulum ou de billes enduites de FGF-2 (15). Ce résultat contradictoire par rapport à l'activité de FGF-2 sur les corticotropes suggère donc que la spécification de ce type cellulaire pourrait être régulée négativement à certains niveaux par la signalisation FGF. Cependant, des souris transgéniques surexprimant FGF-8 ventralement montrent une hyperplasie des corticotropes et des mélanotropes (17).

Le rôle de la signalisation dorsale des FGFs a aussi été étudié *in vivo* par la production d'animaux transgéniques. Sous le contrôle des séquences promotrices du gène de l' α -GSU, FGF-8 a été exprimé de façon erronée dans les régions ventrales de l'hypophyse. Ces animaux montrèrent une absence des types cellulaires ventraux et intermédiaires, ce qui est consistant avec le rôle des FGFs dans la détermination positionnelle des lignées cellulaires hypophysaires dorsales (17). Le phénotype obtenu fut associé à une expansion de la population cellulaire de l'ectoderme de la poche, une caractéristique similaire aux poches de Rathke anormales observées chez les souris naines Ames qui présentent une mutation spontanée du gène *Prop-1* (33;34). Ce dernier (décrit en détail plus loin) est requis pour la progression ventrale des types cellulaires de l'hypophyse antérieure. La signalisation FGF contribue donc aussi à la prolifération des cellules progénitrices hypophysaires.

L'analyse de souris ayant subi l'ablation du gène codant pour le récepteur de type 2 aux FGFs a permis d'apporter des évidences expérimentales supplémentaires concernant le rôle essentiel que joue la signalisation des FGFs dans le développement de

l'hypophyse (27). En effet, le récepteur FGFR2(IIIb), une isoforme provenant de l'épissage différentiel de l'ARN (2) qui est exprimée dans la poche de Rathke (31), fut suggéré comme étant capable de rendre l'ectoderme oral compétent à répondre aux signaux FGFs émanant du diencephale ventral (16). FGF-10, un ligand pour ce récepteur, est exprimé dans le neuroectoderme à partir de E14 (35). L'ablation du gène codant pour FGF-10 ou pour FGFR2(IIIb) résulte en un arrêt du développement de l'hypophyse après la formation de la poche rudimentaire (27;36). Globalement, il semble que FGF10 et FGF8 jouent des rôles critiques dans la morphologie précoce ainsi que dans les événements prolifératifs de l'organogenèse hypophysaire.

Signaux intrinsèques: En plus des signaux dorsaux émanant de l'infundibulum (BMP4, FGF8/10), la morphologie de la poche de Rathke au-delà de E10 est gouvernée par des signaux ventraux issus du mésenchyme, de même que par l'activité de signaux intrinsèques, incluant BMP2 et Wnt4 exprimés dans la poche en développement (2;6). Ceux-ci contribuent à l'établissement de l'identité positionnelle des types cellulaires hypophysaires ventraux (2). BMP2 est initialement détecté dans la partie la plus ventrale de la glande E9.5 en invagination, à la frontière ventrale entre la poche de Rathke et l'expression de Shh au sein de l'ectoderme oral (17). Plus tard, vers E12.5, l'expression de BMP2 se répand dans l'ensemble de la poche (15;17). Issu du mésenchyme caudal, le signal Chordin, un antagoniste des BMP2/4, permet potentiellement de maintenir un gradient d'expression ventrodorsal pour BMP2 (17).

Le rôle de la signalisation BMP2 a été étudié *in vivo* par la surexpression ventrale de BMP2/4 sous le contrôle de l'information régulatrice de l' α -GSU. Dans ce cas, une expansion dorsale des domaines d'expression de *GATA-2*, *Isl-1* et *Msx-1*, des marqueurs de lignées cellulaires ventrales, fut observée (17). De façon similaire, la culture de poches de Rathke en présence de BMP2 est suffisante pour induire l'expression de *Isl-1* et de l' α -GSU (15). Ceci suggère que la signalisation BMP2 permet la spécification des cellules progénitrices qui vont donner naissance plus tard aux lignées cellulaires hypophysaires ventrales (2).

Même si les gradients dorsoventral des FGF8/10 et ventrodorsal de BMP2 semblent associés avec la détermination positionnelle de types cellulaires hypophysaires spécifiques, l'atténuation de la signalisation BMP est cependant requise pour la différenciation terminale de ces cellules (17).

1.5.3.2 Facteurs de transcription

Les gradients de signalisation transitoires permettent l'induction de l'expression spatio-temporelle de plusieurs facteurs de transcription spécifiques qui gouverneront ensuite la destinée cellulaire. La partie qui suit décrit les principales classes de facteurs impliqués.

Plusieurs membres de la famille de protéines à homéodomaine LIM sont exprimés dans la poche de Rathke. Nous y retrouvons *Lhx3*, *Lhx4* et *Isl-1*. L'expression du gène *Lhx3* coïncide avec la formation de la poche de Rathke à E9.5 (37;38). Dans les souris mutantes pour ce gène, le développement de l'hypophyse s'arrête suite à la formation de la poche rudimentaire. De plus, on dénote l'absence de presque tous les types cellulaires hypophysaires, sauf pour quelques corticotropes restantes (32). Le facteur *Lhx4* joue un rôle redondant avec *Lhx3*, puisque les souris *Lhx4*^{-/-} montrent des défauts sévères de développement hypophysaire seulement dans le contexte des mutants hétérozygotes *Lhx3* (26).

Par rapport à l'expression de *Lhx3* et *Lhx4* à l'intérieur de la poche de Rathke, *Isl-1* est initialement exprimé dans la poche, mais devient restreint aux populations cellulaires ventrales à partir de E10.5 (17). Induit *in vivo* et *in vitro* par les BMPs (15), le domaine d'expression ventral de *Isl-1* corrèle avec la diminution du signal BMP4 émanant de l'infundibulum et l'apparition du signal BMP2 dans la poche. Dans les souris mutantes *Isl-1* (39), l'invagination de la poche de Rathke survient normalement, mais les cellules épithéliales qui la composent ne prolifèrent plus (31).

La prolifération des cellules de la poche de Rathke requiert aussi l'activité de facteurs à homéodomaine de type Paired. Cette famille comprend entre autre Prop-1 (« Prophet of Pit-1 »), qui est exprimé dans la poche à partir du dixième jour du

développement pour finalement ne plus être détecté aux alentours de E16, au moment où apparaissent les marqueurs de différenciation terminale hypophysaire (2). Prop-1 a été identifié par clonage positionnel comme étant le gène responsable d'une forme de nanisme lié à un défaut hypophysaire chez les souris Ames (33). L'étude de ces souris mutantes a révélé que Prop-1 est essentiel pour l'apparition des trois types cellulaires de l'hypophyse dépendantes du facteur Pit-1 (décrit plus loin), soit les somatotropes, les lactotropes et les thyrotropes (33;34). En plus de son rôle dans la détermination des lignées Pit1 dépendantes, Prop-1 semble aussi requis pour l'établissement ou le maintien de deux autres types cellulaires hypophysaires, les gonadotropes et les corticotropes (figure 1.5). En effet, les patients qui combinent une déficience hormonale hypophysaire avec des mutations du gène *PROPI* humain, présentent un déficit gonadotrope (40-42) et même corticotrope dans 50% des cas (43;44). Ceci suggère que Prop-1 est nécessaire à l'apparition et à l'expansion de tous les types cellulaires de l'hypophyse antérieure, incluant les gonadotropes et les corticotropes.

Un autre facteur à homéodomaine de type Paired, Rpx/Hesx1, est exprimé dans l'hypophyse. Ce facteur appartient à une famille de protéines à homéodomaine qui contient en N-terminal un domaine de répression « eh-1 », originellement découvert chez la *Drosophile* (45). L'inactivation du gène *Rpx* entraîne une morphogenèse aberrante de l'hypophyse (46). De plus, l'expression de ce dernier débute très tôt, vers E6.5, dans la plaque neurale antérieure pour être ensuite restreint à l'ectoderme oral et à la poche de Rathke jusqu'au jour E13.5 (47). L'atténuation de l'expression de Rpx coïncide avec l'apparition des marqueurs de différenciation terminale des types cellulaires de l'hypophyse antérieure (33;47), suggérant donc que la diminution de l'expression de Rpx est nécessaire pour la progression du développement de l'adénohypophyse. En effet, Rpx est un répresseur transcriptionnel qui peut hétérodimériser avec Prop-1 et recruter le corépresseur TLE, inhibant ainsi l'activité de Prop-1 (45;48). Rpx agit donc comme un antagoniste des fonctions de Prop-1 *in vivo*, ce qui permet l'apparition des lignées dépendantes de Pit-1 vers E13.5 (33;34;45) (figure 1.5). D'ailleurs, un cas d'antagonisme semblable basé sur l'hétérodimérisation entre deux homéodomaines de type Paired fut démontré chez le Xénope (49). En effet, au cours du développement du Xénope, Mix1 permet de bloquer la duplication de l'axe induite par la protéine siamois, une protéine à

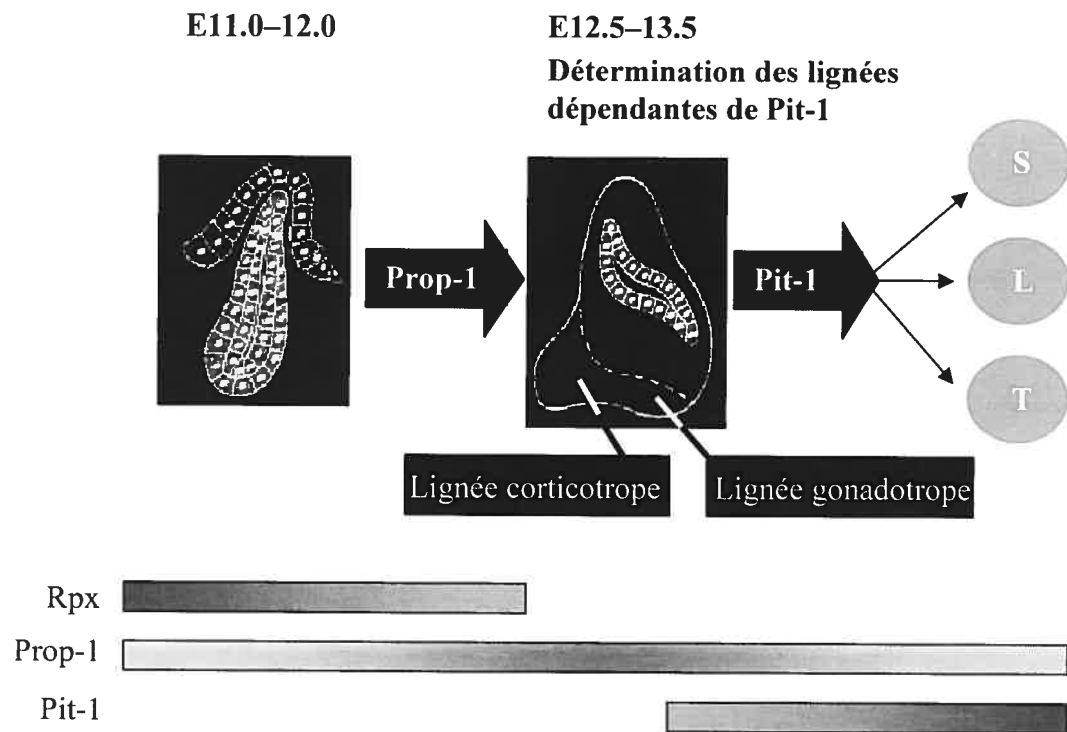


Figure 1.5: Rôle de Prop-1 et de Pit-1 au cours du développement hypophysaire murin. Basé sur l'analyse moléculaire des souris mutantes Ames, la protéine à homéodomaine Prop-1 a été démontrée comme étant requise pour la progression ventrale des types cellulaires de l'hypophyse antérieure et pour l'extinction de l'expression de Rpx entre les jours E12 et E13. Cette extinction permet l'apparition des lignées dépendantes du facteur à homéodomaine POU, Pit-1, soit les somatotropes (S), les lactotropes (L) et les thyrotropes (T). Des mutations du gène *PROPI* au sein de multiples allèles humaines ont révélé que Prop-1 est requis aussi pour la génération de deux autres lignées non dépendantes de Pit-1, les gonadotropes et les corticotropes.

Adapté de Gage, P. J. et al. "The ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *rpx* transcription and initiation of lineage- specific cell proliferation." *Molecular Endocrinology* 10.12 (1996): 1570-81.

homéodomaine. Les conséquences fonctionnelles de l'interaction entre Prop-1 et Rpx peuvent donc définir la prolifération spatio-temporelle permettant le passage de la poche de Rathke à l'adénohypophyse.

Impliqué dans la détermination ventrale et dorsale, la protéine à homéodomaine de type Paired, Pax6, est exprimée dans le lobe antérieur selon un gradient dorso-ventral (6). Les souris Pax6^{-/-} montrent une augmentation du nombre de thyrotropes et gonadotropes, au dépend des lignées plus dorsales somatotropes et lactotropes (50;51).

Appartenant à une large famille de facteurs de transcription contenant un domaine POU, Pit-1 fut originellement identifié par l'analyse des protéines régulant la transcription des gènes de l'hormone de croissance et de la prolactine (52;53) (figure 1.6a). L'analyse génétique des souris dwarf de Snell et Jackson a montré que Pit-1 est requis pour l'apparition des lignées hypophysaires somatotropes, lactotropes et thyrotropes (54;55). Pit-1, en collaboration avec d'autres facteurs et/ou cofacteurs, est directement impliqué dans la régulation transcriptionnelle des marqueurs hormonaux de différenciation terminale de ces types cellulaires. En plus d'interagir en coopération avec des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription, Pit-1 peut s'associer, à un second niveau, avec différents coactivateurs ou corépresseurs en réponse aux signaux hypothalamiques. En effet, selon la cascade de signalisation activée, Pit-1 peut interagir directement ou indirectement avec différents complexes transcriptionnels corégulateurs. Afin de permettre l'activation de la transcription, ces complexes incluent des histones acétyltransférases (HAT) dont la protéine de liaison à CREB (CBP) et le coactivateur p/CAF (56;57). Inversement, l'association peut s'effectuer avec des corépresseurs comme N-CoR et les histones déacétylases (HDAC) pour réprimer la transcription (56). L'activité de Pit-1 en réponse à différents signaux peut donc être régulée par la modulation de ses interactions avec des composantes de la machinerie transcriptionnelle.

Plus particulièrement au niveau des somatotropes, plusieurs groupes ont démontré qu'il existait une coopérativité entre Pit-1, le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque (RAR) et de l'hormone thyroïdienne (TR) dans le contrôle de l'expression du gène de

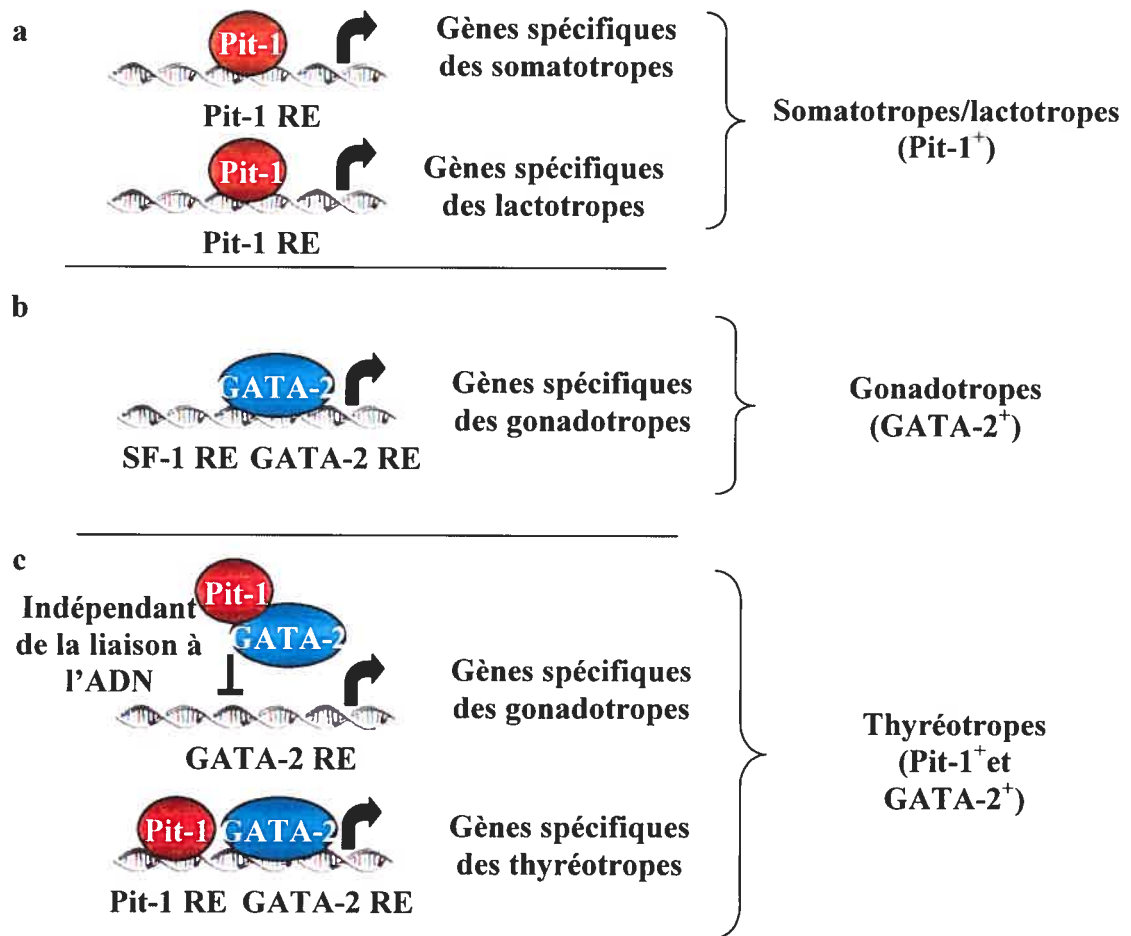


Figure 1.6: Modèle de différenciation des lignées somatotropes, lactotropes, gonadotropes et thyrotropes. (a) Modèle d'action de Pit-1 dans la génération des lignées somatotropes et lactotropes. Le facteur de transcription Pit-1 est exprimé et requis pour la différenciation des somatotropes et des lactotropes. (b) Modèle d'action de GATA-2 dans la génération de la lignée gonadotrope. GATA-2 agit en combinaison avec d'autres facteurs, tel que SF-1, pour permettre la différenciation gonadotrope. (c) Modèle d'action de GATA-2 et de Pit-1 dans la génération des lignées thyrotropes et gonadotropes. Dans les thyrotropes, Pit-1 exerce une transrépression indépendante de la liaison à l'ADN au niveau des promoteurs dépendant de l'activité de GATA-2, inhibant ainsi la différenciation en gonadotropes. Inversement, GATA-2 et Pit-1 agissent en synergie pour activer la transcription de TSH β .

Adapté de K.M. Scully & M.G. Rosenfeld, *Science*. 295, 2231 (2002).

l'hormone de croissance (*GH*) (58;59). En effet, une séquence de 320 pb du promoteur proximal du gène de la *GH* contenant des sites de liaison pour Pit-1 et pour des récepteurs nucléaires, est suffisante pour initier l'expression de *GH* dans les somatotropes *in vivo* (60).

D'un autre côté, la transcription du gène de la prolactine (*Prl*) est contrôlée par une série d'éléments situés sur le promoteur proximal et distal. Chacun de ceux-ci contient plusieurs sites de liaison pour Pit-1 qui sont nécessaires et suffisants pour diriger l'expression spécifique dans les lactotropes *in vivo* (61). Comme pour les somatotropes, Pit-1 interagit avec différents partenaires afin de permettre la transcription de *Prl*. En effet, il fut démontré que le récepteur nucléaire aux oestrogènes (ER) pouvait activer l'expression du gène de la prolactine en synergie avec Pit-1 sur un site enhancer distal (62). D'ailleurs, les souris ayant subi l'ablation génique de l'isoforme α du gène *ER*, montrent une diminution marquée de l'expression du gène *Prl* ainsi que du nombre de cellules lactotropes (63). D'autres facteurs peuvent réguler l'activité de ce gène en coopération avec Pit-1 sur des éléments proximaux. En effet, cette régulation implique deux facteurs contenant des domaines ETS : Ets-1 et ERF. Un rôle spécifique pour Ets-1 dans l'hypophyse a été initialement identifié par la caractérisation d'un site de liaison pour Pit-1/Ets-1 sur le gène *Prl* qui confère une synergie entre ces protéines (64;65) et qui est régulé par l'activité des voies MAPK (64;66). Cette synergie entre Ets-1 et Pit-1 peut d'ailleurs être inhibée par ERF, un facteur répresseur pour les Ets (67). Les interactions entre Ets-1, ERF et Pit-1 peuvent donc fournir un mécanisme moléculaire pour expliquer les effets inhibiteurs de la dopamine sur l'expression du gène de la prolactine. Une troisième classe de facteur qui a été impliquée dans le contrôle de la transcription du gène *Prl* est la classe de gènes *Pitx*, qui peut aussi agir en synergie avec Pit-1 (68-70).

GATA-2 est une protéine à motif de doigts de zinc induite ventralement par le gradient ventro-dorsal du signal BMP2 (17;71). Originellement identifié comme un facteur impliqué dans le développement du système hématopoïétique, GATA-2 semble être une composante importante du programme de développement des gonadotropes et des thyroïdotes. Dans les gonadotropes, il agit en combinaison avec d'autres facteurs

comme SF-1, Egr-1 et Pitx1 (71-75) (figure 1.6b). À ses plus hauts niveaux d'expression dans les gonadotropes, GATA-2 semble inhiber l'activation du gène *Pit-1* (71). Cependant, dans les thyrotropes, où les niveaux d'expression de GATA-2 sont plus faibles, les gènes spécifiques de la différenciation en gonadotropes sont inhibés par Pit-1 (figure 1.6c). En effet, cette inhibition est possible, en partie, puisque Pit-1, exprimé à des niveaux élevés dans les thyrotropes, peut inhiber la liaison de GATA-2 à ces promoteurs cibles ne contenant pas de site Pit-1 adjacent. Dans ce cas, l'action de Pit-1 sur GATA-2 est indépendante de la liaison à l'ADN et reflète donc une interaction directe entre ces deux protéines (71). Inversement, Pit-1 et GATA-2 agissent en synergie sur des gènes spécifiques contenant des sites de liaison adjacents pour chacun de ces deux facteurs, comme c'est le cas au niveau du promoteur TSH- β (71;76) (figure 1.6c).

Comme mentionné un peu plus haut, la différenciation gonadotrope dépend de l'action de GATA-2 en combinaison avec d'autres facteurs. Un de ceux-ci, SF-1, fut montré comme ayant un rôle important au niveau des axes hypothalamo-hypophyso-gonadien et –surrénalien (77). SF-1 (aussi désigné NR5A1) est un récepteur nucléaire orphelin exprimé dans l'hypothalamus, l'hypophyse, les gonades et les surrénales. Dans l'hypophyse, son expression débute vers E13.5 et est restreinte aux gonadotropes (78). Des études réalisées au sein du laboratoire ont permis de démontrer que les cellules hypophysaires se différenciaient à partir d'un précurseur commun et que SF-1 (avec GATA-2) favorisait l'établissement de la lignée gonadotrope (79). SF-1 possède plusieurs rôles, tel que mis en évidence par l'analyse des souris invalidées pour ce dernier. Ces souris ont des organes génitaux femelles, indépendamment du sexe génétique, ne possèdent pas de glande surrénale ni de gonade et par conséquent, meurent dans la première semaine après la naissance d'insuffisance surrénalienne (80). Au niveau de l'hypophyse, les cellules gonadotropes des souris SF-1^{-/-} montrent une expression altérée pour de nombreux gènes qui régulent la reproduction, incluant les gènes de la LH- β , de la FSH- β , de l' α -GSU et du récepteur de la GnRH (GnRHr) (72). De plus, le phénotype de ces souris est associé à une ablation du noyau ventro-médial de l'hypothalamus (VMH), une région de l'hypothalamus liée à la régulation de l'appétit ainsi qu'au comportement sexuelle femelle (81;82).

Finalement, la différenciation terminale des corticotropes et des mélanotropes nécessite l'activité de Tpit, un facteur à boîte T (79;83). Ce facteur de transcription est un partenaire obligatoire des protéines à homéodomains Pitx1 et 2 pour l'expression de POMC dans les corticotropes (16). De plus, le facteur de transcription de type bHLH, NeuroD1, exprimé préférentiellement dans les cellules corticotropes, mais absent des cellules mélanotropes, contribue aussi à la transcription histo-spécifique du gène POMC en synergie avec Pitx1 (84;85). Le rôle de chacun de ces facteurs sera décrit en détail plus loin.

1.6 Découverte de la pro-opiomélanocortine

La pro-opiomélanocortine, POMC, est le polypeptide précurseur de l'ACTH. Initialement découverte dans les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse, la POMC fut par la suite décrite comme ayant d'autres aspects physiologiques. L'ère des précurseurs polypeptidiques hormonaux a débuté vers la fin des années 1960 avec la découverte et la caractérisation de la pro-insuline par Steiner (86). Au même moment, Li et Chrétien (87) démontrèrent que les lipotrophines (β - et γ -LPH) étaient les précurseurs de l'hormone β -MSH (β -melanocyte-stimulating hormone). D'un autre côté, les travaux de Yalow & Berson ont amené l'idée que l'ACTH pouvait aussi être issu d'un précurseur (88). En effet, à partir d'extraits de thymocytes tumoraux associés à un cas de sécrétion ectopique d'ACTH, ils montrèrent que ce peptide était présent dans une forme de haut poids moléculaire immunoréactive. La recherche d'un précurseur pour l'ACTH fut donc lancée. Les principaux progrès sont venus d'études de marquage métabolique et de pulse-chase utilisant la lignée cellulaire AtT-20, dérivée d'une tumeur hypophysaire. Ceux-ci montrèrent que des acides aminés marqués, incorporés au sein du précurseur ACTH de haut poids moléculaire, pouvaient être immunoprécipités par un anticorps contre l'ACTH, mais aussi contre la β -LPH et la β -endorphine (89). Finalement, le groupe de Numa a obtenu l'ADNc du précurseur de l'ACTH, cloné à partir d'ARNm codant (90). La séquence révéla ensuite les liens moléculaires unissant l'ACTH, les LPHs et la β -endorphine.

1.6.1 Le gène POMC et son expression dans différents tissus

Chez l'humain, le gène de la POMC est présent en une seule copie par génome haploïde. Situé sur le chromosome 2p23, il comprend 7665 paires de bases (pb) et consiste en trois exons ainsi que deux introns (3). L'exon 1 de 87 pb ne contient seulement que des séquences non traduites. L'exon 2 (152 pb) code pour le peptide signal et pour les premiers acides aminés de la partie N-terminale de POMC (NT). Finalement, l'exon 3 contient 833 pb et code pour la majorité de l'ARNm traduite, c'est-à-dire la partie C-terminale du NT, le peptide JP («joining peptide»), l'ACTH et la β -LPH (91;92) (figure 1.7). Le NT inclus deux ponts disulfures intramoléculaires, stabilisant ainsi une structure en boucle composée d'acides aminés amphipathiques. Ce motif conformationnel semble jouer un rôle de signal moléculaire permettant le passage de POMC dans la voie de sécrétion régulée (93).

Dans les corticotropes, l'ARNm mature de POMC comprend 1072 nucléotides (nt) et est généré suite à l'épissage du transcrit primaire et à l'ajout de la queue poly A d'environ 200 nt (3). Les 801 nucléotides de la région codante sont traduits en préPOMC qui débute avec un peptide signal de 26 acides aminés nécessaire pour la translocation de la protéine naissante à travers la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (94). Le peptide signal est rapidement clivé afin de permettre à la protéine de s'engager dans la voie de sécrétion. À ce moment, les 241 acides aminés constituant la molécule de POMC codent pour les peptides NT, JP, ACTH et β -LPH (3). La POMC est alors prête à subir la maturation.

L'ARNm de POMC a été retrouvé par différents groupes au sein de plusieurs tissus non hypophysaires. Dans la plupart de ces tissus, tels que les glandes surrénales, le thymus et les testicules, l'expression du gène *POMC* est quantitativement et qualitativement différente par rapport à celle dans l'hypophyse. Effectivement, la concentration en messagers de POMC s'y trouvant est extrêmement basse et ceux-ci sont généralement courts et tronqués. Ces transcrits résultent d'une initiation hétérogène de la transcription à l'extrémité 5' de l'exon 3 (95-97). Ils sont donc non fonctionnels et ne peuvent pas être traduits efficacement. D'un autre côté, l'ARNm de POMC fut également retrouvé au sein d'une population bien définie de neurones situés dans le noyau arqué de

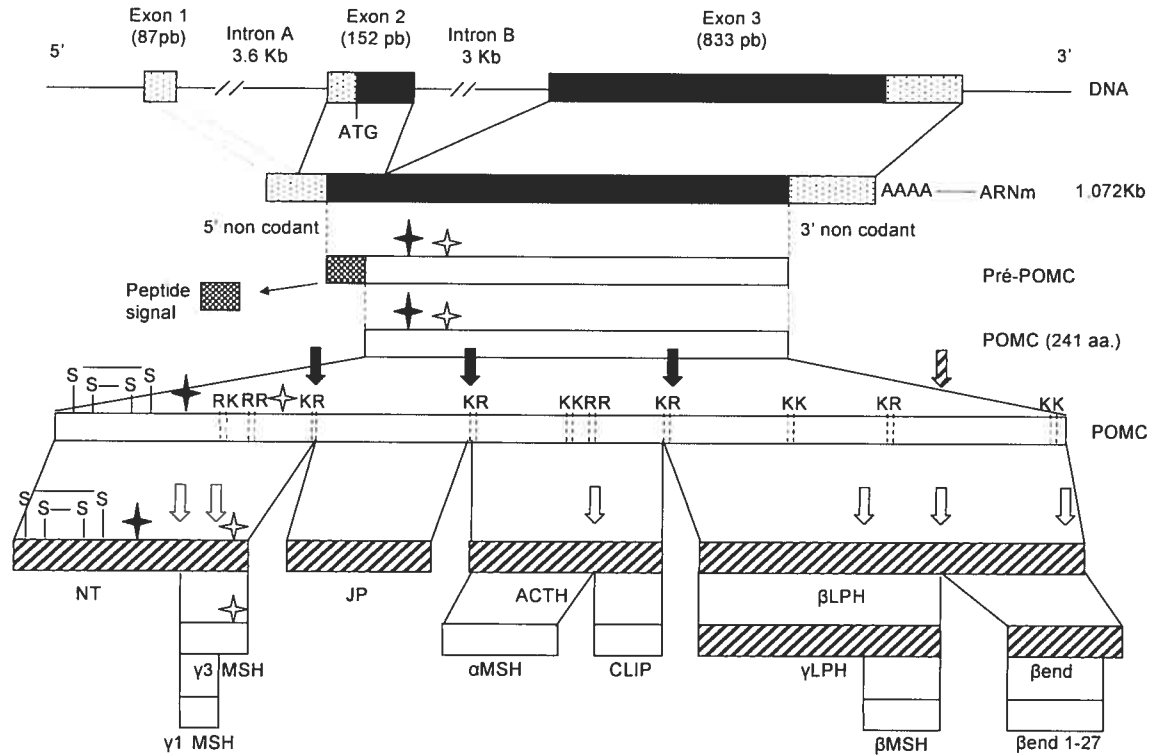






Figure 1.7 : Structure, maturation et expression du gène *POMC*. Adapté de M. L. Raffin-Sanson & Bertagna, *European Journal of Endocrinology*. 149, 79-90 (2003).

Légende:

- | | | | |
|---|--|-----|-------------------------|
|  | Séquences non codantes | S-S | Pont disulfure |
|  | Séquences codantes | ★ | Thr: O-glycosylation |
|  | Peptides produits dans l'hypophyse antérieure | ✱ | Asn: N-glycosylation |
|  | Peptides produits dans le lobe intermédiaire et l'hypothalamus | K | Lysine |
| | | R | Arginine |
| | | ↓ | Clivage par PC1 |
| | | ↘ | Clivage partiel par PC1 |
| | | ⇓ | Clivage par PC2 |

l'hypothalamus (98-100). Les produits de maturation de POMC retrouvés à cet endroit sont similaires à ceux présents dans les mélanotrope (101). Les peptides produits joueront ensuite différentes fonctions cérébrales (102;103). L'expression du gène *POMC* de même que la production de peptides MSH a aussi été démontrée dans les kératinocytes, les mélanocytes ainsi que les cellules endothéliales microvasculaires du derme. Ainsi, la possibilité d'un rôle auto/paracrine influençant la pigmentation de la peau fut soulevée. De plus, le niveau d'expression du transcrit de 1072 nt se trouvant dans ces types cellulaires est augmenté suite à une radiation aux ultraviolets (UV) (104-106).

1.6.2 Maturation de POMC

Une fois que la POMC a atteint la lumière du RER, elle suit le trafic intracellulaire des protéines sécrétées vers l'appareil de golgi et ultimement dans les granules de sécrétion, où les produits de maturation sont emmagasinés avant d'être sécrétés par exocytose. Pendant le transport, la molécule de POMC subit une série de clivages protéolytiques et de transformations chimiques qui permettent la maturation du précurseur en une variété de peptides biologiquement actifs.

Le précurseur POMC contient huit paires et un quadruplet d'acides aminés basiques (lysine et arginine) qui constituent des sites de clivages potentiels pour les enzymes de maturation (figure 1.7). Dans les cellules corticotrope du lobe antérieur, seulement quatre de ces sites de clivages sont utilisés. La maturation dans ce type cellulaire génère donc le peptide NT, JP, l'ACTH, la β -LPH, de même qu'une petite quantité de γ -LPH et de β -endorphine, puisque le dernier site de clivage n'est utilisé que partiellement (107-109). Un mode alternatif de maturation de POMC prend place dans les cellules mélanotrope du lobe intermédiaire des rongeurs ainsi que dans l'hypothalamus chez l'humain. En effet, on y retrouve des peptides plus petits, puisque tous les sites de clivage y sont utilisés. Par conséquent, le peptide NT donne naissance au γ -MSH, l'ACTH est mûr en α -MSH ainsi qu'en CLIP (corticotropin-like intermediate peptide) et finalement, la β -LPH est mûrée en β -MSH et en β -endorphine (β end₍₁₋₂₇₎) (108;110-112).

Les enzymes qui participent spécifiquement à la protéolyse du précurseur polypeptidique ont été associées à une superfamille homologue aux enzymes subtilisin-like, les prohormones convertases. La découverte des deux premiers membres de cette famille, PC1 (appelé PC3) et PC2 (113;114) a permis de révéler les mécanismes qui mènent à la maturation alternative de POMC dans les corticotropes et les mélanotropes (115;116). Dans les corticotropes, seul PC1 est présent et son action protéolytique est limitée, donc seulement quatre sites de clivage sont utilisés et le produit majoritaire est l'ACTH. D'un autre côté, PC1 et PC2 sont présents dans les mélanotropes et leurs actions coordonnées ou en synergie génèrent les plus petits fragments précédemment décrits (117;118) (figure 1.7).

De plus, les peptides générés peuvent subir des modifications chimiques telles que la glycosylation, l'amidation, la phosphorylation, l'acétylation et la sulphatation (3). Certaines de ces modifications sont spécifiques du type cellulaire et vont altérer la fonction biologique du peptide, contribuant ainsi à la diversité globale des produits de maturation de POMC.

1.6.3 Effets biologiques des peptides dérivés de la maturation de POMC

L'ACTH est le seul peptide dérivé de POMC possédant une action précise sur les fonctions surrénales (119). En effet, l'ACTH est le seul ligand connu pour le récepteur de type 2 de la mélanocortine (MC2-R) situé au niveau de la membrane cellulaire des surrénales (120). La liaison de l'ACTH induit la production de l'AMPc menant à la stéroïdogénèse. Du point de vue pathologique, la sécrétion d'ACTH par un adénome hypophysaire ou bien l'expression ectopique d'ACTH sont associées au syndrome de Cushing (121).

Sécrétées par les cellules corticotropes humaines, l'ACTH, la β -LPH et la γ -LPH contiennent une séquence heptapeptidique commune responsable de leurs effets mélanostimulants via l'activation des récepteurs MC1-R (122). D'autres peptides mélanostimulants, l' α -MSH et la β -MSH, ne sont pas produits dans l'hypophyse humaine. Cependant, ils peuvent être produits par des tumeurs sécrétant l'ACTH. Chez les patients atteints du syndrome de Cushing, la surproduction d'ACTH, de β -LPH et de

γ -LPH contribue à la pigmentation de la peau. L'activation des récepteurs MC1-R dans les mélanocytes favorise la synthèse de eumélanine, ce qui résulte en une coloration brune de la peau. Sans l'activation du récepteur MC1-R, le pigment rouge, la phéomélanine, est produit (123). Chez l'homme, la contribution des peptides dérivés de POMC dans la pigmentation physiologique fut démontrée par le phénotype «red-hair» associé aux enfants déficients en POMC (124).

Pour sa part, la séquence en N-terminale de la molécule POMC fut associée à des effets mitogènes sur les cellules surrénales (125). Ces effets furent observés *in vitro* sur des cellules surrénales en culture traitées avec le peptide NT (125). De plus, il fut montré *in vivo* que l'infusion de ce peptide prévenait partiellement l'atrophie des surrénales chez les rats ayant subis une ablation de l'hypophyse (126).

Plusieurs effets anti-inflammatoires tels que la suppression de la fièvre induite par les interleukines IL-1 et IL-6, l'induction du médiateur anti-inflammatoire IL-10 et l'inhibition des fonctions des macrophages ainsi que de la migration des leucocytes ont été décrits pour l' α -MSH (127). D'un autre côté, l' α -MSH et la γ -MSH, produites par les neurones hypothalamiques du noyau arqué, agissent via les récepteurs MC4-R et MC3-R respectivement pour jouer des rôles essentiels dans le contrôle de l'appétit et dans la régulation de l'homéostasie énergétique (124).

Finalement, la β -endorphine, produite localement par les neurones hypothalamiques, possède des fonctions analgésiques en agissant sur les récepteurs opioïdes (3).

L'importance relative des différents peptides dérivés de POMC est venue de l'analyse de souris POMC^{-/-} ainsi que de patients ayant des mutations au niveau du gène *POMC*. Ces humains, de même que les souris affectées, montrent des problèmes d'insuffisance surrénale, d'obésité et de pigmentation (83).

1.7 Mécanismes de transcription histo-spécifiques de POMC

L'activation de la transcription histo-spécifique du gène *POMC* requiert l'action simultanée de plusieurs facteurs ayant un patron d'expression restreint aux corticotropes ou bien à un sous-ensemble de lignées hypophysaires. La découverte de plusieurs de ces facteurs fut menée à terme suite à la recherche d'éléments régulateurs régissant la transcription de *POMC*. Ces recherches ont par le fait même permis l'identification de sa séquence promotrice. La partie qui suit portera sur la structure du promoteur du gène *POMC* ainsi que sur les facteurs impliqués dans sa régulation transcriptionnelle.

1.7.1 Le promoteur POMC

Vers la fin des années 80, des recherches effectuées au sein de certains laboratoires, dont celui du Dr Drouin, ont permis d'identifier des séquences promotrices requises pour l'expression spécifique du gène *POMC* de rat dans l'hypophyse (128;129). En souris transgéniques (129), ces séquences confèrent l'expression de *POMC* dans les cellules corticotropes du lobe antérieur ainsi que dans les mélanotropes du lobe intermédiaire. En utilisant les cellules AtT-20 comme modèle corticotrope, la séquence du promoteur requise pour l'expression appropriée dans l'hypophyse fut localisée de -480 à +63 paires de bases (129;130). Cette analyse a suggéré que trois domaines différents du promoteur contribuaient à son activité : le domaine proximal PE (-166/-34), central CE (-323/-166) et distal DE (-480/-323). Cependant, des délétions furent générées et les résultats obtenus en transfection démontrèrent que l'activité du promoteur dépendait principalement des domaines distal et central (128). La région centrale du promoteur contient plusieurs éléments de réponse requis pour l'activité en souris transgéniques (130;131). Des expériences d'empreintes à la DNase I ont démontré l'existence d'au moins deux sites AT-riches, le CE-1 et le CE-2, pouvant être liés par des protéines qui ne semblaient pas reconnaître d'autres éléments sur le promoteur (132). Plus tard, en 1996, le clonage de *Pitx1* a d'ailleurs permis d'identifier un autre élément, le CE-3, qui s'avéra être une composante centrale dans la spécificité tissulaire d'expression de *POMC* (133).

Le domaine central possède une activité à lui seul, cependant le domaine distal exerce une activité seulement lorsqu'il est en combinaison avec le domaine central.

D'ailleurs, en souris transgéniques, la délétion de la partie distale du promoteur résulte en une perte significative de l'activité. En effet, une baisse d'activité d'environ 1000 fois fut observée *in vivo* par l'utilisation du rapporteur luciférase en fusion avec le promoteur POMC délété versus type sauvage (84).

De son côté, le domaine proximal confère une activité transcriptionnelle indépendamment de la présence des deux autres domaines. De plus, ce domaine recrute certains facteurs ubiquitaires ce qui peut expliquer sa faible contribution à la spécificité tissulaire d'expression de POMC.

Le promoteur (-480/+63 pb) est exprimé seulement dans les lobes antérieur et intermédiaire des hypophyses transgéniques, mais pas dans l'hypothalamus. Ainsi, l'expression de POMC au niveau de cette région semble impliquer la présence d'éléments régulateurs différents (134).

Grâce à l'utilisation de la technique d'empreinte à la DNase I et à la mutagenèse, plusieurs éléments régulateurs ont été identifiés à l'intérieur du promoteur POMC humain et rat (131;132;135-137). De plus, les résultats de ces études indiquèrent la présence de protéines apparentées capables de lier l'ADN pour permettre l'activité transcriptionnelle. Les facteurs ayant été montrés importants pour la transcription de base de POMC incluent : AP-1, PO-B, les facteurs de transcription COUP-like, Sp1-like, AP-2-like, PP1 (appelé Putative Pituitary POMC 1), Brn3.0 et E2F spécifiquement pour le promoteur humain (130-132;138-143) (figure 1.8).

L'activité spécifique aux corticotropes du promoteur POMC fut investiguée en utilisant les cellules AtT-20 en comparaison avec d'autres cellules hypophysaires et des fibroblastes (132;144). Comme énoncé plus haut, la spécificité de transcription de POMC dans les corticotropes semble être entièrement conférée par les domaines distal et central. Plus précisément, cette spécificité est possible grâce à la synergie existante entre ces deux domaines. L'analyse détaillée des régions distale (144) et centrale (133) du promoteur a révélé que la plupart des éléments régulateurs ne conféraient pas la spécificité. Un seul élément compris à l'intérieur de chacun des domaines a plutôt été identifié comme ayant

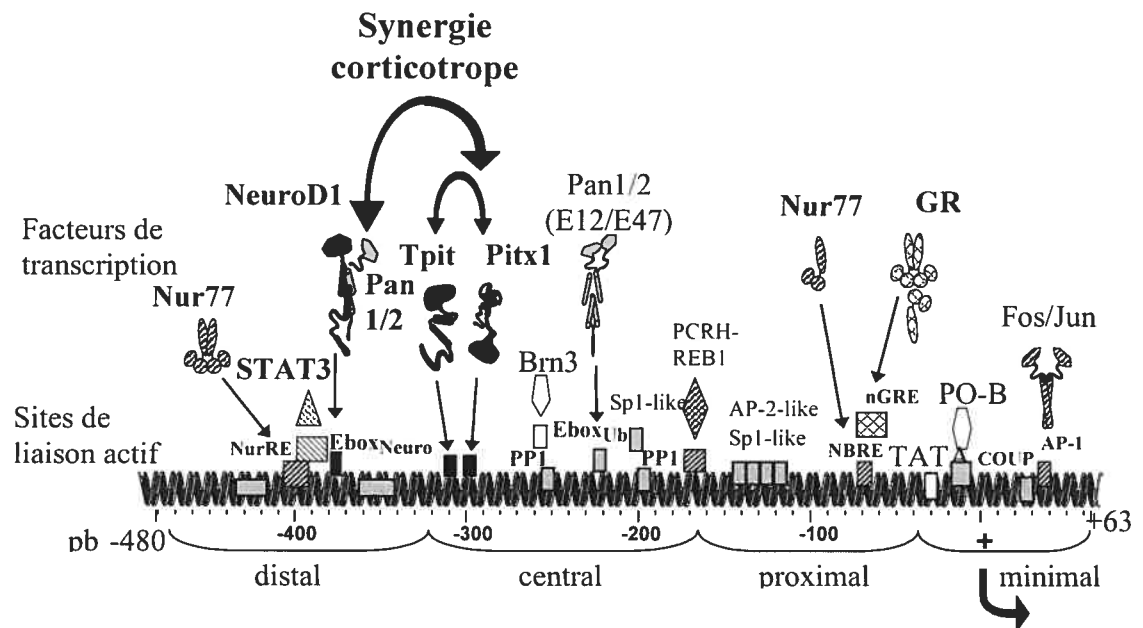


Figure 1.8: Représentation schématique du promoteur POMC, de ces éléments régulateurs (boîtes) et des facteurs de transcription apparentés. La transcription histo-spécifique du gène POMC au sein des cellules corticotropes requiert la présence de Pitx1, Tpit et de l'hétérodimère contenant NeuroD1 (tous représentés en gras). La synergie transcriptionnelle spécifique aux corticotropes dépend de l'interaction physique entre ces trois facteurs.

Adapté de Nudi, M., E. Batsche, and J. Drouin. "Ontogeny of the Pituitary Corticotroph System." Ed. R. C. Gaillard and S. Melmed. *Endocrine Updates Series*. Hingham MA USA: Kluwer Academic Publishers, 2003. 1-6.

les propriétés nécessaires à la synergie et à la transcription histo-spécifique de POMC. L'élément important du domaine central s'avère contenir des sites de liaison contigus pour Pitx1 et Tpit (le CE-3), tandis que dans le domaine distal, au niveau du DE-2, l'élément essentiel est reconnu par le bHLH neurogénique NeuroD1 (figure 1.8).

1.7.2 Le facteur bHLH NeuroD1

La classe de facteurs de transcription bHLH (motif hélice-boucle-hélice basique) a été étudiée longtemps pour son rôle dans les processus de myogenèse et de neurogenèse comme régulateur spécifique de la détermination cellulaire. NeuroD1/Beta2 est un bHLH de classe B exprimé dans le pancréas, l'intestin (145;146), l'hypophyse (84;85) ainsi que dans plusieurs parties du système nerveux (147). D'ailleurs, l'expression ectopique de NeuroD1 dans les cellules ectodermiques d'ovocytes de xénopes est suffisante pour induire la différenciation des cellules en neurones (147). Beta2, l'homologue hamster de NeuroD1, fut cloné indépendamment comme un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression du gène de l'insuline (145). Dans les cellules corticotropes de l'hypophyse murine en développement, la protéine NeuroD1 est détectée transitoirement entre les jours 12 et 15 embryonnaires (84;85). Ensuite, ce facteur chute en expression pour n'être presque plus détecté chez l'adulte. Chez l'humain, la protéine NeuroD1 est présente dans les corticotropes adultes ainsi que dans les adénomes sécrétant de l'ACTH (148). Cette présence reflète donc une certaine importance de ce facteur sur la transcription de POMC dans les tissus normaux et tumoraux. De plus, l'expression de NeuroD1 précède de peu l'apparition de POMC, lui conférant ainsi un rôle possible dans la différenciation corticotrope. L'analyse des souris mutantes pour NeuroD1 a d'ailleurs montré un phénotype hypophysaire intéressant. En effet, l'expression de POMC semble être retardée dans les cellules corticotropes de ces souris. De façon précoce, vers E13.5, le nombre de corticotropes est diminué tandis qu'à E16.5, la différenciation corticotrope a repris complètement, puisque les cellules POMC positives se retrouvent en nombre et en distribution normale (149).

Pour l'activation transcriptionnelle de POMC, NeuroD1 lie l'ADN seulement en hétérodimère avec les bHLH ubiquitaires de classe A comme Pan 1/2 (E12/E47) (150). L'élément de réponse lié par l'hétérodimère contenant NeuroD1 est situé dans la partie

distale du promoteur et est responsable de l'activation synergique de la transcription de POMC. Ce site de liaison à boîte E pour les facteurs de transcription bHLH est appelé la boîte E_{neuro} (85;144). La synergie entre les domaines distal et central du promoteur résulte de l'interaction protéique entre le partenaire d'hétérodimérisation de NeuroD1, Pan1, et Pitx1 (84). Cette interaction est appuyée par des études *in vitro* de même qu'*in vivo* où des complexes protéiques composés de Pitx1 et des bHLH furent révélés par co-immunoprécipitation à partir de cellules AtT-20 (84). Dans le même ordre d'idée, le facteur à homéodomaine spécifique du pancréas, Pdx1, montre aussi une synergie avec l'hétérodimère Pan1/NeuroD1 au niveau du promoteur de l'insuline du rat (151). Cependant, cette synergie semble dépendre d'une interaction moléculaire différente. En accord avec ce mécanisme d'interaction, NeuroD1 lui-même n'est pas requis au sens strict pour l'activation transcriptionnelle du promoteur POMC, puisque le remplacement de la boîte E_{neuro} par une boîte E liée par des homodimères de bHLH ubiquitaires (boîte E_{ubi}) permet de restaurer l'activité du promoteur (84). Le rôle de NeuroD1 dans la transcription de POMC est réalisé par son habilité à reconnaître la séquence spécifique de la boîte E_{neuro}.

1.7.3 Les facteurs Pitx (Ptx)

Pitx1 fut identifié comme un régulateur transcriptionnel du gène *POMC* (133) et comme un facteur interagissant avec la protéine à homéodomaine Pit-1 (68). En plus de son rôle au niveau de l'hypophyse, Pitx1 est important dans le développement craniofacial ainsi que dans la spécification de l'identité des membres postérieurs (75;152). Pitx2 possède les mêmes fonctions que Pitx1 (153), mais il contrôle également l'asymétrie gauche/droite au cours du développement embryonnaire (154). Chez l'humain, des mutations au sein du gène Pitx2 sont une des causes du syndrome de Rieger, une malformation craniofaciale (155). Le dernier membre de la famille Pitx, Pitx3, n'est pas exprimé dans l'hypophyse, mais plutôt dans le cerveau, plus particulièrement au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire du mésencéphale (156).

Pitx1 et Pitx2 sont co-exprimés dans l'ectoderme oral, dans l'hypophyse en développement ainsi que dans toute l'hypophyse adulte. Ils possèdent tous les deux des

activités transcriptionnelles similaires sur plusieurs promoteurs spécifiques de l'hypophyse comme POMC, α -GSU, LH β , FSH β , TSH β , PRL et GH (157). Les facteurs Pitx contribuent à la spécificité d'expression des gènes encodant des hormones par leur interaction synergique avec des facteurs ayant des patrons d'expression restreints à certaines lignées. Les facteurs Pitx interagissent donc physiquement pour exercer une activation transcriptionnelle synergique avec Pit-1 sur les promoteurs GH et PRL (68;70). De plus, ils contribuent à l'activité du promoteur LH β par son interaction synergique avec la protéine à doigts de zinc Egr-1 et le récepteur nucléaire orphelin SF-1 (70;158;159). Au sein des cellules corticotropes, l'interaction de Pitx avec NeuroD1 (via Pan1) ainsi qu'avec le facteur histo-spécifique Tpit est nécessaire pour conférer l'activité hautement spécifique au promoteur POMC (149). D'ailleurs, l'activité de Pitx1 est complètement dépendante de l'interaction avec Tpit (83). Leurs sites de liaison se trouvent à une distance de seulement 3-5 paires de bases. Des études *in vitro* de liaison ont suggéré que l'interaction de Pitx1 et Tpit sur l'ADN est coopérative, fournissant ainsi une base moléculaire pouvant expliquer la dépendance des deux facteurs pour l'activité transcriptionnelle.

En tant qu'activateur transcriptionnel, Pitx1 lie sous forme de monomère un site unique situé dans la partie centrale du promoteur POMC. Son domaine de liaison est un homéodomaine de la famille Paired. En plus de contenir Pitx1, 2 et 3, la sous-famille Pitx est reliée à la famille bicoid chez la drosophile et comprend les membres Otx1, Otx2 et gooseoid chez les mammifères (160). Les interactions entre l'homéodomaine de Pitx avec les facteurs bHLH et Tpit ont été démontrées pour les trois membres de la famille Pitx, mais pas pour les facteurs de transcription Otx reliés (83). Par conséquent, les facteurs Pitx1, 2 et 3 peuvent avoir des activités redondantes partielles dans les cellules ou les tissus exprimant plus qu'un des membres de la sous-famille. Comme Pitx1 et 2 sont co-exprimés pendant le développement de l'hypophyse, la redondance entre ces deux facteurs peut expliquer la présence de cellules exprimant POMC dans les embryons déficients en Pitx1 ou Pitx2 (153;161).

1.7.4 Le facteur histo-spécifique Tpit

Le marqueur corticotrope Tpit (aussi appelé Tbx19) fut identifié comme un partenaire obligatoire de Pitx1 pour l'activation de la transcription de POMC (83). Tpit lie l'ADN sur un élément T situé tout près du site de liaison de Pitx1. Les membres de la famille de facteurs de transcription à boîte T, comme Tpit, sont impliqués dans le développement, la morphologie (162) ainsi que dans la différenciation de plusieurs tissus (83) telle que le mésoderme embryonnaire (163), le cortex neural (164) et les cellules T helper (165). Les facteurs à boîte T sont définis par un motif de liaison à l'ADN connu sous le nom de boîte T, nommé ainsi après la découverte du premier gène à boîte T, T ou Brachyury (166). L'élément de réponse de Tpit est presque identique au demi site de l'élément palindromique T décrit pour Brachyury (T) (167). Au sein de la famille à boîte T, Tpit possède une séquence davantage similaire à Brachyury lui-même. D'ailleurs, dans les essais de transfection, T peut substituer Tpit pour permettre l'activation de POMC, mais le facteur Tbx1, qui est co-exprimé avec Tpit dans les cellules AtT-20, ne le peut pas (83).

Tpit est seulement présent dans les deux lignées exprimant POMC, c'est-à-dire les corticotropes et les mélanotropes (83). De façon intéressante, Tpit n'est pas exprimé dans les neurones POMC hypothalamiques ou bien dans les mélanocytes. Comme pour NeuroD1, l'expression de Tpit dans les corticotropes débute aux alentours de E12, juste avant POMC. En utilisant le promoteur α -GSU pour permettre l'expression de Tpit dans les cellules non différenciées de la partie rostrale de l'hypophyse en développement, des expériences de gain-de-fonctions en souris transgéniques ont montré que ce facteur pouvait induire l'expression ectopique de POMC (83). La partie rostrale est une structure transitoire qui semble contenir des cellules précurseurs (168) qui n'expriment normalement pas POMC, mais qui contiennent de hauts niveaux de Pitx1 (169). En présence de Pitx1, Tpit s'avère donc être suffisant pour induire l'expression de POMC dans des cellules non différenciées.

Le patron d'expression de Tpit restreint aux corticotropes suggère que ce facteur possède un rôle dans la différenciation de ce type cellulaire. En utilisant l'ACTH en immunohistochimie comme marqueur de l'expression de POMC et donc de la

différenciation terminale, cette hypothèse s'est avérée être vraie. En effet, les cellules corticotropes et mélanotropes chez les souris mutantes pour *Tpit* ne parviennent pas à la différenciation terminale, même si la détermination des corticotropes précoces semble intacte (79). De plus, *Tpit* a été montré comme ayant un rôle négatif sur la différenciation des gonadotropes via un mécanisme d'antagonisme avec le récepteur nucléaire orphelin SF-1, dont l'expression est restreinte à ce type cellulaire (79). L'antagonisme bidirectionnel entre *Tpit* et SF-1 déterminera donc l'établissement de la lignée corticotrope versus gonadotrope.

Comme mentionné auparavant, les défauts génétiques au sein du gène *POMC* humain sont associés à des problèmes d'insuffisance surrénale, d'obésité et de pigmentation (83). L'hypocorticisme et l'hypoglycémie sont associés avec l'insuffisance en ACTH, une condition qui fut aussi observée chez certains patients atteints d'un déficit isolé en ACTH (c'est-à-dire une déficience en ACTH hypophysaire sans d'autres défaillances hormonales) (170;171). Étant donné que *Tpit* possède une expression restreinte aux cellules ACTH positives, c'est-à-dire les corticotropes, la recherche de mutations dans le gène *TPIT* fut entreprise au départ sur trois enfants nés avec un déficit isolé en ACTH. Des mutations au sein du gène *TPIT* furent identifiées chez deux de ces trois cas initiaux (83). Dans un premier cas, une unique mutation homozygote fut identifiée dans la séquence codante, résultant en l'introduction d'un codon de terminaison prématuré. Le transcrit défectueux pouvait donc être éliminé facilement par un mécanisme de surveillance connu sous le nom de NMD («non-sense mediated mRNA decay») (172), entraînant une perte de fonction complète. Les parents de cet enfant ainsi qu'une grand-mère étaient des porteurs sains, donc hétérozygotes pour la mutation. Le deuxième enfant analysé présentait un génotype hétérozygote pour une mutation unique qui échangeait le résidu sérine 128 pour une phénylalanine. Ce résidu est conservé dans le domaine à boîte T de tous les gènes à boîte T connus. La protéine *Tpit* mutante ainsi produite peut donc agir comme un dominant négatif qui vient inhiber les fonctions normales de *Tpit* et par le fait même, expliquer la perte de fonction apparente chez ce patient.

Toujours chez des enfants atteints d'un déficit isolé en ACTH néonatale, d'autres mutations au sein des exons du gène *TPIT* furent identifiées. En plus des deux cas déjà discutés précédemment, huit différentes mutations supplémentaires furent documentées (173;174). Deux nouvelles mutations non-sense résultant en un codon de terminaison prématuré furent identifiées, de même que trois autres mutations ponctuelles, une délétion d'une paire de bases, une autre de 37 paires de bases à l'intérieur de l'exon deux ainsi qu'une large délétion contenant les exons trois et quatre. Chacun des patients analysés étaient homozygotes pour une mutation au niveau du gène *TPIT*, sauf pour un patient hétérozygote composé. Celui-ci avait reçu un allèle comportant une mutation ponctuelle de son père et un allèle *TPIT* maternel contenant la délétion affectant les exons trois et quatre. À ces mutations s'ajoute un onzième cas, caractérisé par le groupe de Metherell qui identifia un nouvel hétérozygote composé portant une mutation ponctuelle ainsi qu'une délétion d'une paire de bases au niveau de l'exon six (175).

En accord avec l'importance du gène *TPIT* pour l'expression de POMC chez les patients humains, il semble que le site de liaison de *Tpit* soit sujet à la méthylation des cytosines dans les cellules qui n'expriment pas POMC en comparaison avec les cellules l'exprimant (176).

1.8 Régulation hormonale de l'expression de POMC

L'hypophyse est une glande centrale au sein de plusieurs axes physiologiques importants. Parmi eux, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) est impliqué dans la réponse au stress et par le fait même, dans la régulation hormonale de l'expression de POMC. Dans cette partie, je traiterai d'abord du rôle de cet axe ainsi que des divers facteurs qui y sont induits en réponse à l'hormone hypothalamique CRH pour contrôler l'expression de POMC. J'enchaînerai ensuite avec la description de deux autres signaux exogènes qui modulent aussi l'activité du promoteur POMC, c'est-à-dire la signalisation LIF ainsi que la répression par les glucocorticoïdes.

1.8.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et l'activation CRH

Au niveau de l'hypophyse adulte, la régulation de l'expression de POMC résulte de la balance entre les signaux stimulateurs en provenance de l'hormone hypothalamique

CRH et les signaux négatifs induits par les glucocorticoïdes (Gc). La réponse aiguë agit principalement sur la libération des hormones emmagasinées dans les vésicules de sécrétion, tandis que l'action à long terme est exercée à travers des changements transcriptionnels. Chez la souris, l'expression de POMC devient régulée de façon hormonale par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien aux alentours du jour embryonnaire 15.5-16 (177).

Au sommet de l'axe HPA trône le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus où l'hormone hypothalamique CRH est produite et relâchée dans le réseau capillaire du système porte. Au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse, les cellules corticotropes expriment à leur surface membranaire le récepteur CRHR-1 (178). Ce dernier est un récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G (179). La liaison du CRH à son récepteur entraîne l'activation de l'adénylate cyclase, la production d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA) (180). PKA a été montré comme agissant par l'entremise des facteurs de transcription CREB, ATF1/2 ou CREM dans différents systèmes ainsi que par le recrutement de coactivateurs comme CBP/p300 (181). Cependant, l'absence de site de liaison pour CREB sur le promoteur POMC ne supporte pas l'hypothèse que ce facteur ait un rôle à jouer dans l'activation de la transcription de POMC par le CRH (182). Des études portant sur la caractérisation des étapes précoces de réponse corticotrope au CRH ont montré que PKA entraînait aussi l'activation des voies MAPK de même que l'accumulation de calcium intracellulaire via les canaux calciques de types L et P (183-186) contribuant ainsi à l'activation transcriptionnelle du locus POMC. En réponse au CRH, l'augmentation de la transcription de POMC mène à l'élévation de sa concentration cytoplasmique en ARNm. Cet effet est mimé par des analogues de l'AMPc ou par la forskoline (180) et ne semble pas nécessiter la synthèse de protéines *de novo*, puisqu'un traitement à la cycloheximide n'affecte pas la réponse au CRH (187;188).

Afin de permettre l'activation transcriptionnelle de POMC, plusieurs facteurs de transcription sont induits suite à l'action du CRH ou de l'AMPc. Entre autre, notons le facteur PCRH-REB-1 qui est exprimé dans l'hypophyse et induit suite à une stimulation CRH sur des cellules AtT-20 sans sérum (137;189). Cependant, le rôle exact de ce

dernier dans l'activation de POMC par le CRH reste à être défini. D'un autre côté, le domaine proximal (PE-1) du promoteur POMC contient un site de liaison pour le facteur de transcription AP-1 (132). Celui-ci fut montré comme étant impliqué, en partie, au niveau de la transcription de POMC suite à une stimulation CRH. En effet, le traitement CRH mène à l'induction de c-fos, une composante du complexe AP-1, qui active ensuite la transcription de POMC via la liaison au site AP-1 (141;190). D'autres membres de la famille AP-1 ont d'ailleurs été décrits comme ayant un rôle sur la transcription de POMC en réponse au CRH (191). Par contre, la mutagenèse du site AP-1 n'empêche pas l'activation transcriptionnelle de POMC par le CRH (190;192), ce qui implique l'existence de mécanismes différents.

1.8.2 La sous-famille de récepteurs nucléaires orphelins Nur

La localisation des séquences sensibles au CRH sur le promoteur POMC a mené à l'identification de site de liaison pour la sous-famille de récepteurs nucléaires orphelins de Nur77 (192). Il fut d'ailleurs démontré que les membres de cette sous-famille sont activés par le CRH et que la surexpression d'un mutant dominant négatif de Nur77 bloque cet effet (192). De plus, ce même mutant empêche l'induction de l'activité du promoteur POMC par la forskoline (192).

Dans les cellules AtT-20, le CRH stimule l'activité et l'expression des tous les membres de la sous-famille de récepteurs nucléaires orphelins Nur (192;193). Cette sous-famille inclue Nur77 (aussi appelé NGFI-B) (194), Nurr1 (Nur-related factor 1) (195) et NOR-1 (Neuron-derived orphan receptor 1) (196). Ceux-ci possèdent une forte homologie au niveau du domaine à doigts de zinc de liaison à l'ADN, une homologie modérée dans le domaine de liaison du ligand et détiennent un domaine N-terminal légèrement divergent (197). Ces trois récepteurs nucléaires orphelins agissent comme des gènes de réponse précoce dans une variété de systèmes cellulaires (198) et sont exprimés dans chaque organe de l'axe HPA (199). En effet, l'expression de Nur77 est hautement induite en réponse au stress dans les neurones produisant le CRH situés dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (200;201). Le stress est aussi à l'origine de stimuli qui augmentent l'expression des facteurs Nur dans l'hypophyse et le cortex surrénale (192;199;202;203). Dans les cellules Y1 dérivées des surrénales, un traitement à l'ACTH

induit Nur77 et Nurr1, menant à l'augmentation de la transcription du gène encodant le stéroïde 21 α -hydroxylase (199;204), une enzyme limitante de la stéroïdogénèse. D'autre part, deux membres de la sous-famille Nur ont aussi été montrés importants dans le développement du répertoire des cellules T. En effet, Nur77 et NOR-1 sont hautement induits suivant la stimulation par le récepteur des cellules T (TCR), ce qui mène à l'apoptose des thymocytes immatures et immunodéficients (205-207). Cette observation fut confirmée dans les cellules LNCaP, une lignée cellulaire dérivée du cancer humain de la prostate où les stimuli apoptotiques entraînent la translocation de Nur77 du noyau vers la mitochondrie, permettant la relâche du cytochrome c et l'apoptose (208). Les signaux issus de l'activation du TCR menant à la sélection négative par apoptose semblent effectivement converger vers les voies de signalisation Nur, puisque la surexpression d'un mutant dominant négatif de Nur77 ou bien l'utilisation d'un ARNm antisens pour Nur77, empêche l'apoptose induite par le TCR (206;207).

Nur77 fut le premier récepteur nucléaire montré comme étant capable de lier l'ADN en tant que monomère pour activer la transcription. La séquence cible de liaison de Nur77, le NBRE («NGFI-B response element»), fut identifiée par sélection génétique chez *Saccharomyces cerevisiae* (203). Cet élément de réponse situé à -63 paires de bases sur le promoteur POMC est composé d'un octanucléotide contenant le motif de liaison canonique des récepteurs nucléaires, AGGTCA, précédé par deux adénines. La reconnaissance de ces adénines dépend d'un domaine appelé boîte A composé de résidus qui ne sont pas à motif de doigts de zinc (209). Plus tard, l'activation de la transcription via la liaison au NBRE fut montré pour Nurr1 et NOR-1 (205;210;211). Malgré l'importance du NBRE, la cible principale de l'action CRH et des facteurs Nur sur le promoteur POMC est un palindrome lié par des dimères de facteurs Nur. Cet élément de réponse, appelé le NurRE, se trouve dans la partie distale du promoteur (vers -395 pb) et est constitué de deux demi-sites montrant une homologie partielle avec le NBRE (203). Le NurRE est d'ailleurs beaucoup plus sensible à l'action du CRH que ne l'est le NBRE (192). Il permet la liaison d'homodimères de Nur77 (192) et d'hétérodimères constitués des différents membres de la sous-famille Nur (193). Comme les trois membres de la sous-famille Nur sont activés en réponse au CRH, il est possible que des hétérodimères de composition variée puissent être actifs au NurRE du promoteur POMC.

En plus d'hétérodimériser avec des membres de leur sous-famille, Nur77 et Nurrl1 peuvent aussi hétérodimériser avec le récepteur au rétinoïde X (RXR) afin de permettre la signalisation rétinoïde (211-213). En réponse à une stimulation avec l'acide rétinoïque 9-*cis* (9-*cis* RA), ces hétérodimères sont capables de conférer l'activité transcriptionnelle à un gène rapporteur contenant un élément DR-5 (213). De plus, il fut démontré que Nur77 interagissait avec le facteur COUP-TF, un autre récepteur nucléaire orphelin, pour moduler la sensibilité à l'acide rétinoïque dans les cellules humaines de cancer du poumon (214).

L'analyse des souris ayant subies l'invalidation génique de Nur77 ou Nurrl1 n'a montré aucune déficience au niveau des fonctions hypophysaires ou hypothalamo-hypophysaires. Ce phénomène peut s'expliquer par la redondance observée entre les différents membres de la sous-famille Nur (215;216).

1.8.3 Signalisation LIF

LIF («Leukemia-inhibitory factor») est une cytokine exprimée par de multiples tissus, tels que les testicules, la peau et l'hypophyse. Il exerce son effet suite à l'hétérodimérisation de deux composantes transmembranaires qui constituent le récepteur LIF (LIFR). Celui-ci contient une sous-unité spécifique pour LIF et en partage une autre appelée gp130 avec la superfamille de cytokines IL-6 (217;218). La signalisation LIF passe principalement par la voie Jak-STAT («janus-kinase-signal transducer and activator of transcription»), une voie de signalisation commune pour de nombreuses cytokines (219-222).

Dans plusieurs tissus, l'expression de LIF, LIFR et gp130 est stimulée par une variété de stimuli inflammatoires (223-225), tandis que les glucocorticoïdes viennent réguler négativement leur expression (226-228). Dans l'hypothalamus et l'hypophyse de souris, l'expression du gène *LIF* est augmentée respectivement par le lipopolysaccharide (LPS) (229) ou l'interleukine IL-1 β (230). Chez l'humain et la souris, l'expression de LIF a été caractérisée dans les corticotropes, les tissus hypophysaires adultes et embryonnaires ainsi que dans les adénomes sécrétant l'ACTH (231). De plus, il fut démontré que la signalisation LIF joue un rôle en tant que modulateur paracrine ou

autocrine dans la réponse au CRH. En effet, les cellules AtT-20 stimulées avec LIF sont associées à une augmentation de la sécrétion d'ACTH de 2 à 3 fois plus grande que le niveau de base, tandis que le traitement CRH seul entraîne une élévation de 3 à 7 fois (231-233). Par contre, lorsque coincubée avec le CRH, la stimulation LIF agit en synergie afin de permettre une relâche d'ACTH 2 à 3 fois plus grande qu'en présence de CRH seul (231;232). Dans les cellules corticotropes, l'action de LIF induit la phosphorylation de gp130 (233), STAT3 (232-234), STAT1 α (232;234), STAT1 β (232;234) et p115, une protéine reliée à STAT1 α (234).

Plus précisément, l'expression de POMC de même que la sécrétion d'ACTH induite par LIF ont été montrées comme étant dépendantes de STAT3 dans les cellules AtT-20 (235). De plus, la surexpression de SOCS-3, un inhibiteur des voies Jak-STAT, bloque la phosphorylation de STAT3 issue de la stimulation LIF dans les cellules AtT-20, inhibant ainsi l'activité du promoteur POMC induite par LIF (233). En réponse à l'activation LIF, quelques cibles au niveau du promoteur POMC furent proposées (236), incluant un site de liaison pour STAT3 qui chevauche le NurRE (237).

Le rôle de LIF au niveau du développement fut entre autre investigué par l'analyse de souris transgéniques qui dirigent l'expression de LIF sous le contrôle du promoteur α -GSU (238). Ces souris montrent une hyperplasie des cellules ACTH positives qui composent 65% du lobe antérieur de l'hypophyse comparativement à 13% chez le type sauvage (238). De plus, LIF a été proposé comme étant un régulateur de la différenciation, puisqu'il inhibe la prolifération des cellules AtT-20 (239). Chez la souris ayant subi l'invalidation du gène *LIF*, l'ARNm de POMC est réduite, mais tout de même présente. Cependant, les niveaux d'ACTH et de corticostéroïdes dans le plasma sont normaux (240). L'ensemble de ces données suggèrent donc que LIF peut effectivement jouer un rôle dans le contrôle de l'expression de POMC (240).

1.8.4 Répression par les glucocorticoïdes

La rétro-inhibition exercée par les glucocorticoïdes (Gc) sur la transcription de POMC et la sécrétion d'ACTH est nécessaire pour fermer la boucle de régulation contrôlant l'homéostasie de l'axe HPA. Les Gc exercent leur rétroaction négative au

niveau des neurones de l'hypothalamus et des cellules corticotropes de l'hypophyse. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la répression de la transcription de POMC par les glucocorticoïdes, mais leur pertinence relative dans le développement, l'homéostasie de l'axe HPA et les pathologies reste à définir.

Les effets biologiques des Gc s'effectuent via la liaison à leur récepteur cytoplasmique, le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (241). Une fois lié, GR transloque au noyau pour ensuite interagir avec l'ADN et moduler l'activité de ces gènes cibles. L'activation de la transcription par GR nécessite la présence d'un élément de réponse aux Gc appelé GRE où GR se lie sous forme d'homodimère (242). De façon similaire, des GRE négatifs (nGRE) furent identifiés dans les régions régulatrices des gènes qui sont réprimés par GR. Un site nGRE est d'ailleurs centré à -63 paires de bases sur le promoteur POMC de rat (138;243). Ce nGRE se trouve à l'intérieur des séquences du promoteur requises pour la répression par les Gc dans les cellules AtT-20 (138;243) et en souris transgéniques (129;244). Des études *in vitro* ont montré qu'un trimère de molécules GR lie le nGRE de POMC (245). Le mécanisme exact de cette répression reste toutefois inconnu. Ce complexe trimérique pourrait recruter des co-répresseurs et générer un encombrement stérique pour la liaison de facteurs ayant un effet positif sur la transcription de POMC. Un de ces facteurs à effets positifs, Nur77, pourrait être une cible de cet encombrement, puisque ce dernier possède un élément de réponse (le NBRE) qui chevauche le nGRE.

En parallèle avec les travaux effectués sur le nGRE de POMC, plusieurs autres gènes réprimés par les Gc furent identifiés comme étant exempts de sites de liaison pour GR. Par exemple, la répression du gène de la collagénase par GR (246;247) fut montré comme étant dépendante d'un antagonisme entre GR et AP-1 impliquant l'interaction physique de ces deux protéines (248). Dans le même ordre d'idée, l'identification du NurRE et de son rôle dans l'activation de la transcription de POMC en réponse au CRH (192) a fourni une cible potentielle d'antagonisme par GR. Il fut d'ailleurs démontré qu'il existait effectivement un antagonisme entre GR et Nur77 impliquant un mécanisme d'interaction protéine-protéine semblable à celui défini entre GR et AP-1 de même qu'entre GR et NFκB (249).

Au niveau de l'axe HPA, les souris mutantes pour GR (GR^{-/-}) sont associées à une augmentation des niveaux de CRH, de POMC hypophysaire (ACTH) et de corticostéroïdes (250). En contraste, des souris générées par des stratégies de «knock-in» exprimant un mutant de GR incapable d'homodimériser (introduction d'une mutation ponctuelle A458T) ne récapitule pas entièrement le phénotype obtenu avec les souris GR^{-/-}. En effet, ce mutant de GR ne peut plus activer la transcription par sa liaison en dimère au GRE, mais conserve la capacité de transréprimer l'activité d'AP-1 et de NFκB par interaction protéine-protéine (251). Ces souris appelées GR^{dim/dim} ne montrent pas d'augmentation des niveaux de CRH, suggérant donc que le rétrocontrôle négatif de l'expression du CRH hypothalamique implique une répression par GR qui soit indépendante de la liaison à l'ADN. D'un autre côté, l'expression de POMC hypophysaire est tout de même augmentée chez ces souris, indiquant que la dimérisation de GR, ainsi que sa liaison à l'ADN, sont requises à ce niveau (252). Ces résultats supportent donc le mécanisme de répression de la transcription de POMC par GR via la liaison au nGRE. Par contre, l'utilisation d'un autre modèle de souris mutantes soutient d'avantage le mode de répression impliquant l'antagonisme entre GR et Nur77. En effet, les souris mutantes pour le gène *CRH* sont associées à une insuffisance chronique en glucocorticoïdes et montrent une réponse au stress altérée (253). Cependant, les niveaux sanguins en ACTH restent constants. Dans ce modèle, l'effet répresseur des Gc sur la sécrétion d'ACTH semble dépendre de la présence de CRH (254). Les résultats obtenus avec ces souris sont donc d'avantage en accord avec le mécanisme de répression dépendant de l'antagonisme des signaux en aval de l'action du CRH, tel que l'antagonisme de l'activité dépendante de Nur77.

1.9 Hypothèses et objectifs de travail

Le gène du bHLH *NeuroD1* est exprimé de façon transitoire dans les cellules corticotropes au cours du développement hypophysaire. Même si les souris déficientes en *NeuroD1* montrent un délai dans la différenciation corticotrope, le nombre de cellules POMC⁺ retourne à la normale vers E16.5, au moment où l'on note une chute d'expression de *NeuroD1* chez la souris sauvage. Ceci indique que *NeuroD1* seul n'est pas suffisant pour le développement des cellules corticotropes. Il est donc possible que

NeuroD1 ne joue qu'un rôle transitoire dans la régulation transcriptionnelle de POMC et qu'il soit remplacé par un autre facteur aux alentours de E15-16 du développement.

Comme l'activité est souvent redondante entre les bHLHs, un remplaçant potentiel pour NeuroD1 pourrait être un autre bHLH, possiblement neurogénique, avec un domaine de liaison à l'ADN semblable à NeuroD1. De plus, l'expression de POMC sous contrôle d'un promoteur ayant la partie distale délétée est diminuée fortement dans les cellules corticotropes de même que dans les mélanotropes. Étant donné que les mélanotropes se différencient juste avant que NeuroD1 chute en expression, un bHLH exprimé dans le lobe intermédiaire pourrait venir jouer un rôle équivalent à celui de NeuroD1 dans les corticotropes.

D'un autre côté, étant donné les évidences spatio-temporelles (la proximité des éléments de réponse NurRE et boîte E_{neuro} ainsi que l'établissement vers E16 du système porte hypothalamo-hypophysaire), le récepteur nucléaire orphelin Nur77, induit en réponse au CRH hypothalamique, serait aussi un candidat potentiel de remplacement de NeuroD1.

Afin de vérifier ces hypothèses, j'ai procédé à la production de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur EGFP sous le contrôle du promoteur POMC intact, boîte E_{neuro} mutée ou NurRE muté. Les lignées mutantes ont permis d'envisager l'importance *in vivo* de chacun des sites NurRE et boîte E_{neuro} au cours du développement hypophysaire. Les résultats obtenus ont ainsi amené des informations supplémentaires concernant la transition entre l'activation du locus POMC et son homéostasie dans le contexte endocrinien adulte.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Plasmides et oligonucléotides

Les plasmides rapporteurs ont été construits dans le vecteur pXP1-luciférase contenant le promoteur POMC minimal (-34 à +63) comme décrit précédemment (255). Les éléments DE2C et CE3 insérés dans les plasmides rapporteurs ont été générés à partir de séquences d'oligonucléotides correspondantes aux régions du promoteur POMC de rat comme décrit précédemment (133;144). Les mutations de la boîte E_{neuro} (CAGATG en CTACCG) ainsi que de l'extrémité 5' du NurRE furent générées comme décrit antérieurement (144;193). La mutagenèse double du site NurRE (en 5' et 3') fut réalisée par PCR à l'aide des séquences d'oligonucléotides sens et antisens respectives suivantes : 5'-ATT **CAT CGA TGA** GAC CTC **ACC CGT** CCA GGA AGG CAG ATG GAC GCA C-3' et 5'-GGA ATG CCA AGC TCA GAT CC-3' (les caractères gras représentent les nucléotides mutés). Le produit de PCR fut ensuite cloné aux sites BamHI/HindIII du vecteur pXP1-luciférase contenant le promoteur POMC minimal. Les constructions contenant le domaine DE2C dimérisé (comportant respectivement le NurRE muté ou la boîte E_{neuro} mutée) et le domaine CE3 trimérisé furent générées à partir des séquences d'oligonucléotides suivantes : 5'-GAT CTC ATT CAT CGA TGA GAC CTC ACC CGT CCA GGA AGG CAG ATG GG-3' et 5'-GAT CCC CAT CTG CCT TCC TGG ACG GGT GAG GTC TCA TCG ATG AAT GA-3' sont les séquences sens et antisens respectives pour le NurRE muté et 5'-GAT CTC ATT AGT GAT ATT TAC CTC CAA ATG CCA GGA AGG CTA CCG GG-3' et 5'-GAT CCC CGG TAG CCT TCC TGG CAT TTG GAG GTA AAT ATC ACT AAT GA-3' sont les séquences sens et antisens respectives pour la boîte E_{neuro} mutée. Ces oligonucléotides furent hybridés, ligasés et clonés en dimère aux sites BamHI/SacI en amont du domaine CE3 trimérisé contenu au sein du vecteur promoteur POMC minimal pXP1-luciférase. Le vecteur d'expression pour le facteur bHLH NeuroD1 utilisé pour cette étude a déjà été caractérisé (145). Le vecteur d'expression CMX-Nur77 contient la séquence complète d'ADNc clonée dans pCMX (256). Finalement, le plasmide d'expression Tpit fut construit dans le même vecteur d'expression (RSV) qu'utilisé précédemment (159).

2.2 Étude de retard sur gel (EMSA)

L'étude de retard sur gel fut réalisée avec des protéines produites avec le système de TNT couplé au lysat de réticulocytes (Promega). Les réactions de liaison ont été réalisées dans un volume de 20 µl contenant 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 40 mM KCl, 1 mM de dithiothreitol (DTT), 6 % glycérol, 0.05 % NP-40, 5 ng de poly(dI-dC) et environ 10 ng de protéines NeuroD1, Pan1 ou Nur77 synthétisée *in vitro*. Nous avons utilisé, par réaction, 50 000 cpm (20 fmol) de sondes d'oligonucléotides doubles brins, marquées par remplissage par le fragment Klenow de la DNA polymérase en présence de [α - 32 P] dATP. La sonde fut purifiée sur colonne G-25 Sephadex. Les séquences d'oligonucléotides (sens) utilisées pour l'étude de liaison sur le NurRE, le NurRE muté en 5' et le double mutant NurRE sont respectivement : 5'-ATG CAG TGA TAT TTA CCT CCA AAT GCC A-3', 5'-ATG CCA TCG ATG AGA CCT CCA AAT GCC A-3' et 5'- ATG CCA TCG ATG AGA CCT CAC CCG TCC A-3'. Les séquences d'oligonucléotides (sens) utilisées pour l'étude de liaison sur la boîte E_{neuro} intact et mutée sont respectivement : 5'-GAT CCG GAA GGC AGA TGG ACG CA-3' et 5'-GAT CCG GAA GGC TAC CGG ACG CA-3'. Les mélanges réactionnels furent incubés pour 10 minutes à 25°C avant d'être mis sur gel. Les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur des gels de 5 % polyacrylamide (29 :1 acrylamide/bisacrylamide) dans un tampon 0.5X Tris-borate-EDTA à 25°C pour 2 heures.

2.3 Culture cellulaire et transfections

Les cellules HEK293 («human embryo kidney») ont été cultivées à 37°C, atmosphère de 5 % CO₂, dans du Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplémenté avec 10 % de serum de veau fœtal (FBS) et 1 % pénicilline/streptomycine, tel que décrit précédemment (159).

Ces cellules ont été transfectées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Brièvement, les cellules sontensemencées à ~ 250 000 cellules par puits, dans des plaques de 12 puits, 24 heures avant la transfection. Comme le facteur Pitx1 et le bHLH ubiquitaire Pan1 sont déjà exprimés dans les cellules HEK293, les précipités en vue de la transfection contiennent 1.5 µg de plasmide rapporteur, 150 ng de RSV-Tpit, 300 ng de pCMX-Nur77 ou 300 ng du bHLH NeuroD1 complété avec du vecteur RSV

vide, pCMX ou pcDNA3 pour avoir un total constant de 500 ng de vecteur d'expression, 12,5 ng de CMV- β gal comme contrôle interne et de l'ADN entraîneur jusqu'à un total de 3 μ g/puit. Le milieu des cellules est changé une heure avant la transfection. Suite à la transfection, les cellules sont rincées au PBS après 24 heures, et du milieu frais est remis sur les cellules pour un autre 24 heures (transfection de 48 heures). Les cellules sont lysées en appliquant directement 200 μ l de tampon d'essai luciférase (100 mM Tris-HCl pH8.0, 0,5% NP-40 et 5 mM DTT). 125 μ l de lysat est utilisé pour tester l'activité luciférase, avec un luminomètre LB953 de marque Berthold. 50 μ l sont ensuite utilisés pour tester l'activité β -galactosidase (kit Galacto-Star, Applied Biosystems). L'activité luciférase est normalisée par l'activité β -galactosidase. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences, faites en duplicata, \pm l'erreur standard sur la moyenne.

2.4 Souris transgéniques et génotypage

Le fragment de micro-injection a été produit à partir du plasmide EGFP-N1 (Clontech). Suite à la digestion AseI/HindIII, le promoteur CMV de ce vecteur fut excisé afin d'être remplacé par le promoteur POMC (intact, double mutant NurRE ou bien boîte E_{neuro} mutée) récupéré par une digestion BamHI/HindIII. La digestion BglII/AflII et la purification sur gel d'agarose ont permis ensuite l'obtention du fragment de 1.6 kb à micro-injecter. Celui-ci contient le promoteur POMC intact vs muté (NurRE ou boîte E_{neuro}) en amont de la séquence codante EGFP suivit par la région polyA de SV40. Les souris transgéniques furent produites comme décrit précédemment (84) et provenaient du fond génétique C57bl/6. En utilisant l'ADN génomique isolé des queues (digestion à la protéinase K), le génotypage des fondateurs a été effectué par Southern blot à l'aide d'une sonde reconnaissant la séquence du EGFP (1 kb). Suite à la vérification de la transmission du transgène à la première génération par Southern blot, les souris furent génotypées par PCR à l'aide des amorces sens et antisens respectives suivantes : 5'-GCT GGA GTA CAA CTA CAA CAG C-3' et 5'-TAC TTG TAC AGC TGC TCC ATG C-3' dirigées contre la partie 3' de la séquence EGFP. Les réactions de PCR ont été faites avec 8 μ l d'ADN génomique isolé des queues traitées à la protéinase K, en présence de 25 pmoles de chaque oligonuléotide, 0,2 mM de dNTPs, 3.75 μ l de DMSO, 5 μ l de tampon de réaction 10X et 1U de Taq polymérase (Invitrogen), dans un volume total de 50 μ l. Le

programme de PCR utilisé : 45 secondes à 94°C, 45 secondes à 63°C, 45 secondes à 72°C pour 30 cycles. Le produit de PCR de 300 pb fut visualisé sur gel d'agarose 1.8 %.

2.5 Production de l'anticorps NeuroD1

L'anticorps polyclonal α -NeuroD1 a été produit et purifié tel que décrit précédemment (257;258). Brièvement, deux lapins (A et B) ont tout d'abord été injectés avec 100 μ g de MBP-NeuroD1 pleine longueur (la construction a déjà été décrite (84)), suivi de 3 rappels subséquents. La purification des anticorps a été effectuée en utilisant des colonnes MBP-Sepharose, pour éliminer les anticorps qui reconnaissaient la partie MBP de l'épitope injecté, et ensuite des colonnes GST-NeuroD1-Sepharose, pour retenir spécifiquement les anticorps qui reconnaissaient NeuroD1.

2.6 Préparation des tissus

Les souris adultes ont été sacrifiées par asphyxie au CO₂, tandis que les embryons, dont l'âge approximatif a été déterminé par la détection d'un bouchon vaginal (à midi de cette journée, la portée était considérée à \sim E0.5), furent obtenus suite à la dislocation cervicale des femelles gestantes. Suite à la dissection, les hypophyses adultes, la tête de l'embryon ou bien ce dernier en entier, furent fixés pour 24 heures au paraformaldéhyde 4 % et enrobés dans la paraffine. Les coupes de 5 μ m ont ensuite été montées sur des lames traitées à l'aminopropylethoxysilane.

2.7 Immunohistochimie et immunofluorescence

Pour les immunohistochimies, les sections ont été déparaffinées, réhydratées et soumises à la procédure suivante: trois traitements au micro-onde de 5 minutes chaque dans 0,1 M de citrate de sodium, pH 6.0, à 240 watts suivis de 20 minutes laissé à température pièce et d'un traitement final de 5 minutes au micro-onde dans le même tampon à 240 watts. Les coupes furent ensuite traitées avec du H₂O₂ 3 % suivi d'une incubation dans 300 mM de glycine. La réaction d'immunohistochimie fut réalisée dans du PBS-0,1 % Tween-20 (PBT). Le bruit de fond non-spécifique fut bloqué avec 10 % de sérum de chèvre dans du PBT pour une heure à température pièce. Les coupes furent rincées dans du PBS et les sections ont été incubées avec l'anticorps lapin anti-Nurr1 (SantaCruz Biotechnology, 1:100) ou bien avec l'anticorps lapin anti-NeuroD1 (1:500)

pour 16 h à 4°C. Les complexes immuns furent révélés par un anticorps anti-lapin biotinylé (1:150) (Vector Laboratory) couplé à la streptavidine conjugué à une peroxidase de raifort (1:1000) (NEM) en utilisant la diaminobenzidine comme substrat. Pour les immunofluorescences, les coupes ont été déparaffinées et réhydratées pour visualiser d'abord la fluorescence émise par le EGFP. Par la suite, les coupes furent soumises aux mêmes traitements que pour l'immunohistochimie pour être incubées avec l'anticorps souris anti-POMC (Cortex Biochem, 1:200) pour la nuit. Finalement, la colocalisation EGFP/POMC a pu être possible suite à la révélation de la POMC endogène avec l'anticorps anti-souris couplé à la rhodamine (ImmunoPure Antibody, 1:200).

2.8 Extraction d'ARN et RT-PCR

L'extraction d'ARN, sur des hypophyses adultes et d'embryons (E14.5 ou E17.5), a été rendue possible grâce au système RNeasy Mini de QIAGEN, en suivant les recommandations. La totalité de l'ARN extraite fut précipitée à l'EtOH/acétate de sodium 3 M (pH5.2) et repris dans le volume de RT (20 µl). Les ADNc furent obtenus suite aux réactions de RT-PCR. Celles-ci ont été réalisées avec l'enzyme AMV-RT (Promega) en suivant les recommandations, en utilisant un oligonucléotide polydT.

2.9 Réactions de Q-PCR

L'ADNc récupéré est par la suite analysé par Q-PCR. Les oligonucléotides suivants ont été utilisés afin de quantifier l'expression EGFP au niveau de l'hypophyse des différents temps du développement testés : 5'-TGA AGG GCA TCG ACT TCA AGG A-3' et 5'-TGG CGG ATC TTG AAG TTC ACC T-3'. Les oligonucléotides, 5'-AGT GAA CTG GCC ACA CAG AAG G-3' et 5'-CTG CCG TTC TTG GTC ACG ATC ATT-3', pour l'amplification de Tpit ont servis de contrôle interne pour normaliser l'expression EGFP. Chaque paire d'oligonucléotides a été trouvée à l'aide du programme Primer Quest d'IDT (<http://www.idtdna.com>). Ils sont spécifiques, puisqu'ils n'amplifiaient qu'un seul produit (courbe de dissociation Mx3005, Stratagene) avec la bonne taille (gel d'agarose). Les résultats récoltés ont été analysés à l'aide du logiciel Mx3005.

2.10 Extraits totaux

Les hypophyses adultes et embryonnaires ont été disséquées, congelées immédiatement sur glace sèche, pour ensuite être broyées et homogénéisées dans 50 μ l (ou 15 μ l pour les hypophyses d'embryons) de tampon A (10 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, et 10 μ g/ml d'inhibiteurs de protéases (leupeptin, aprotinin et pepstatin). Suite à la centrifugation (15 min), 2 μ l du surnageant est utilisé pour la quantification des protéines par analyse Bradford. Le reste du volume d'extraits servira à l'immunobuvardage de type Western (Western blot).

2.11 Immunobuvardage de type Western (Western blot)

Les Western blots ont été faits tel que décrit précédemment (70). En bref, 25 μ g d'extraits totaux provenant d'hypophyses adultes ou embryonnaires sont dénaturés dans du tampon Laemmli (contenant 1%SDS et 1% β -mercaptoéthanol). Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE dénaturant 10% (migration : 125V, 1 heure 30 min dans mini-protéans Bio Rad). Les protéines sont ensuite transférées sur une membranes PVDF (Amersham) par électro-transfert (transfert : 100v, 1 heure 15 min dans tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 20 % éthanol (v/v), pH8.4). Les membranes sont bloquées avec du 5 % lait/0,1 % Tween20/PBS. Les anticorps utilisés : anticorps primaire chèvre EGFP (1:500) ou lapin Tpit (1:1000) dilué dans 5 % lait/0,1 % Tween20/PBS; anticorps secondaire α -chèvre-HRP ou α -lapin-HRP dilués 1:25000 dans 5 % lait/0,1 % Tween20/PBS. La révélation se fait en utilisant le kit ECL-plus (Amersham). Pour la révélation à l'aide du système Odyssey (LI-COR Biosciences), les anticorps secondaires utilisés sont : α -chèvre-IRDye800 (1:25000) pour le signal EGFP (canal 800) et α -lapin-Alexa680 (1:10000) pour le signal Tpit (canal 700). La quantification par Odyssey a été fait en suivant les instructions décrites dans le guide d'utilisation.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Patrons d'expression des facteurs Nur77 et NeuroD1 au cours du développement hypophysaire

3.1.1 Patron d'expression de NeuroD1

En accord avec son rôle précoce dans la régulation transcriptionnelle de POMC, NeuroD1 possède une expression transitoire au cours du développement hypophysaire. Les figures 3.1a, b, c, d nous montre la cinétique d'expression de NeuroD1 qui fut réalisée à l'aide de l'anticorps NeuroD1 purifié, différent de celui de la publication antérieure (84). Sur la figure 3.1d, nous pouvons constater que NeuroD1 est exprimé à des niveaux faibles chez l'adulte et que cette expression résiduelle semble être en partie cytoplasmique.

3.1.2 Les membres de la famille Nur sont exprimés de façon ubiquitaire tout au long du développement hypophysaire

Comme Nur77 est un candidat potentiel pour le remplacement de NeuroD1 dans le maintien de l'expression de POMC, nous avons voulu vérifier la cinétique d'expression de ce facteur au cours du développement hypophysaire. Étant donné qu'aucun anticorps purifié ou disponible commercialement n'est efficace contre Nur77, nous avons opté pour la cinétique d'expression de Nurr1 (figure 3.1e, f, g, h), un membre homologue à Nur77 dans la sous-famille de récepteurs nucléaires orphelins. Puisque l'ARNm de ces deux facteurs possède des patrons d'expression se chevauchant au sein du cerveau de souris, tel que démontré par hybridation *in situ* (259), nous avons envisagé une similarité entre le patron d'expression de Nurr1 et celui de Nur77 en immunohistochimie. Comme on peut le remarquer, les membres de la famille Nur semblent exprimés de façon ubiquitaire au niveau des tissus nerveux de même que dans l'hypophyse en développement et adulte. Les figures 3.1d et h ne montre qu'une partie de la glande adulte.

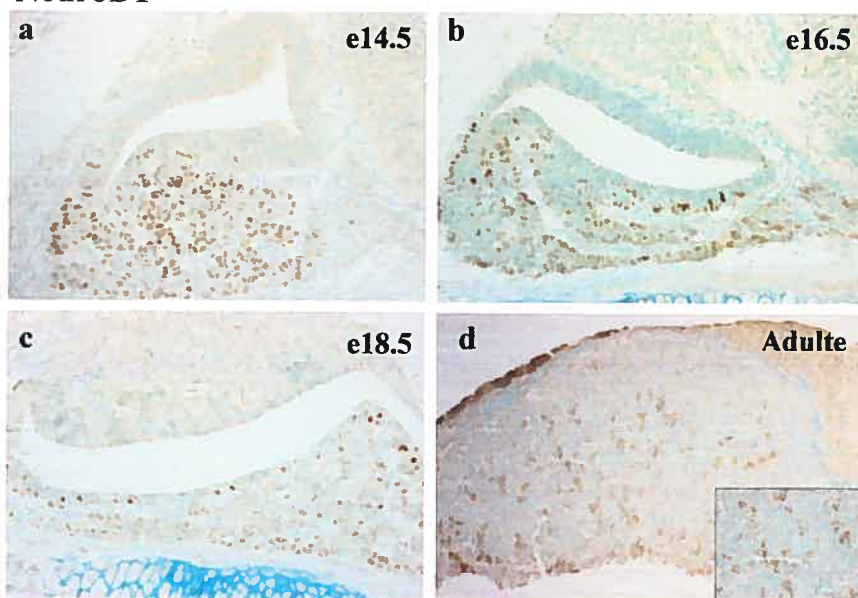
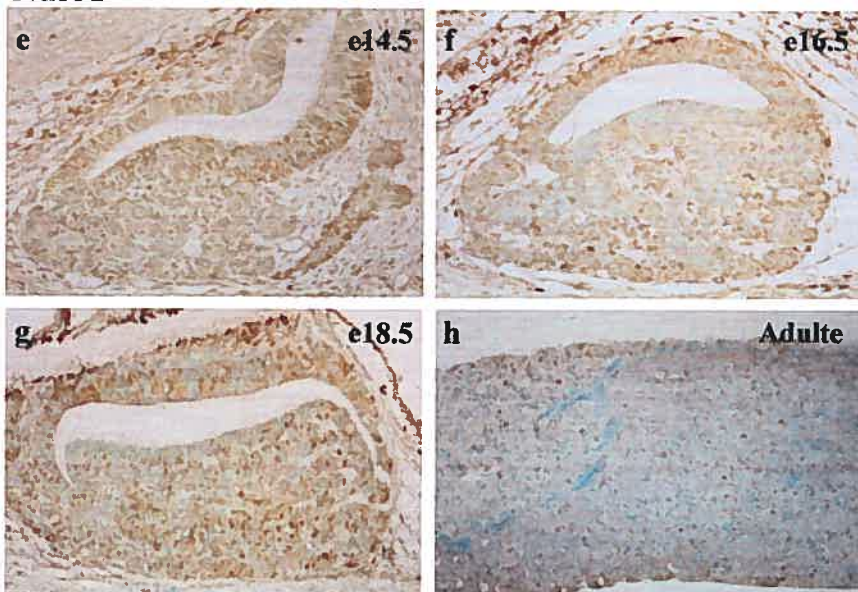
NeuroD1**Nurr1**

Figure 3.1: Cinétique d'expression pour NeuroD1 (a, b, c, d) et Nurr1 (e, f, g, h) au cours du développement hypophysaire. On dénote la chute d'expression pour NeuroD1 aux alentours du jour E16.5 suivit d'une faible expression chez l'adulte. Le grossissement en d montre certains noyaux positifs de même qu'une expression résiduelle qui semble être cytoplasmique pour quelques cellules. Pour sa part, le marquage Nurr1 semble présent de façon ubiquitaire tout au long du développement hypophysaire. Les figures d et h ne montrent qu'une partie de la glande adulte.

3.2 Production des mutations de perte de fonction pour les cibles NeuroD1 et Nur77

3.2.1 Les mutations de la boîte E_{neuro} et du NurRE abolissent la liaison de leurs facteurs

Étant donné que NeuroD1 possède une cinétique d'expression variable et que Nur77 est activé dans la cellule en présence de CRH (7;192), leur élément de réponse respectifs (la boîte E_{neuro} et le NurRE) sont donc des candidats pour expliquer les dynamiques d'expression. Avant de vérifier l'importance *in vivo* de chacun de ces éléments de réponse au cours du développement hypophysaire, nous nous sommes premièrement assurés que les mutations introduites dans ces sites abolissaient complètement la liaison de leurs facteurs respectifs. Pour ce faire, j'ai utilisé la technique de retard sur gel (EMSA) à partir de sondes pour chacun des éléments (intacts vs mutés) et de protéines synthétisées *in vitro*. Comme nous pouvons le voir à la figure 3.2, il n'y a aucune liaison lorsque le tampon (piste ctrl pour contrôle) ou les réticulocytes seuls (Réti : réticulocytes auxquels les plasmides d'expression n'ont pas été ajoutés) sont utilisés. Afin de tester la liaison de NeuroD1 à la boîte E_{neuro}, j'ai dû synthétiser *in vitro* (dans les mêmes conditions) le partenaire de liaison de NeuroD1, le bHLH Pan1. Comme il fut montré précédemment (85), de même qu'à la figure 3.2a, NeuroD1 ne peut lier son élément de réponse qu'en hétérodimère avec des bHLHs ubiquitaires de classe I comme Pan1. Toujours à partir des protéines NeuroD1 et Pan1 synthétisées *in vitro*, j'ai testé la liaison de cet hétérodimère de bHLHs sur la boîte E_{neuro} mutée (CAGATG en CTACCG). Comme nous pouvons le voir à la figure 3.2a (dernière piste), la liaison est abolie.

J'ai entrepris ensuite la même expérience, mais cette fois-ci, sur l'élément de réponse à Nur77 (NGFI-B), le NurRE. Comme démontré antérieurement (192;193), Nur77 peut lier son élément de réponse en monomère ou en homo/hétérodimère avec les différents membres de la famille Nur. La figure 3.2b montre la liaison de Nur77 en homodimère au NurRE intact, une liaison sous forme de monomère lorsqu'un des demi-sites est muté, comme précédemment publié (192), et finalement une absence complète de liaison lorsque les deux demi-sites sont mutés (figure 3.2b, dernière piste).

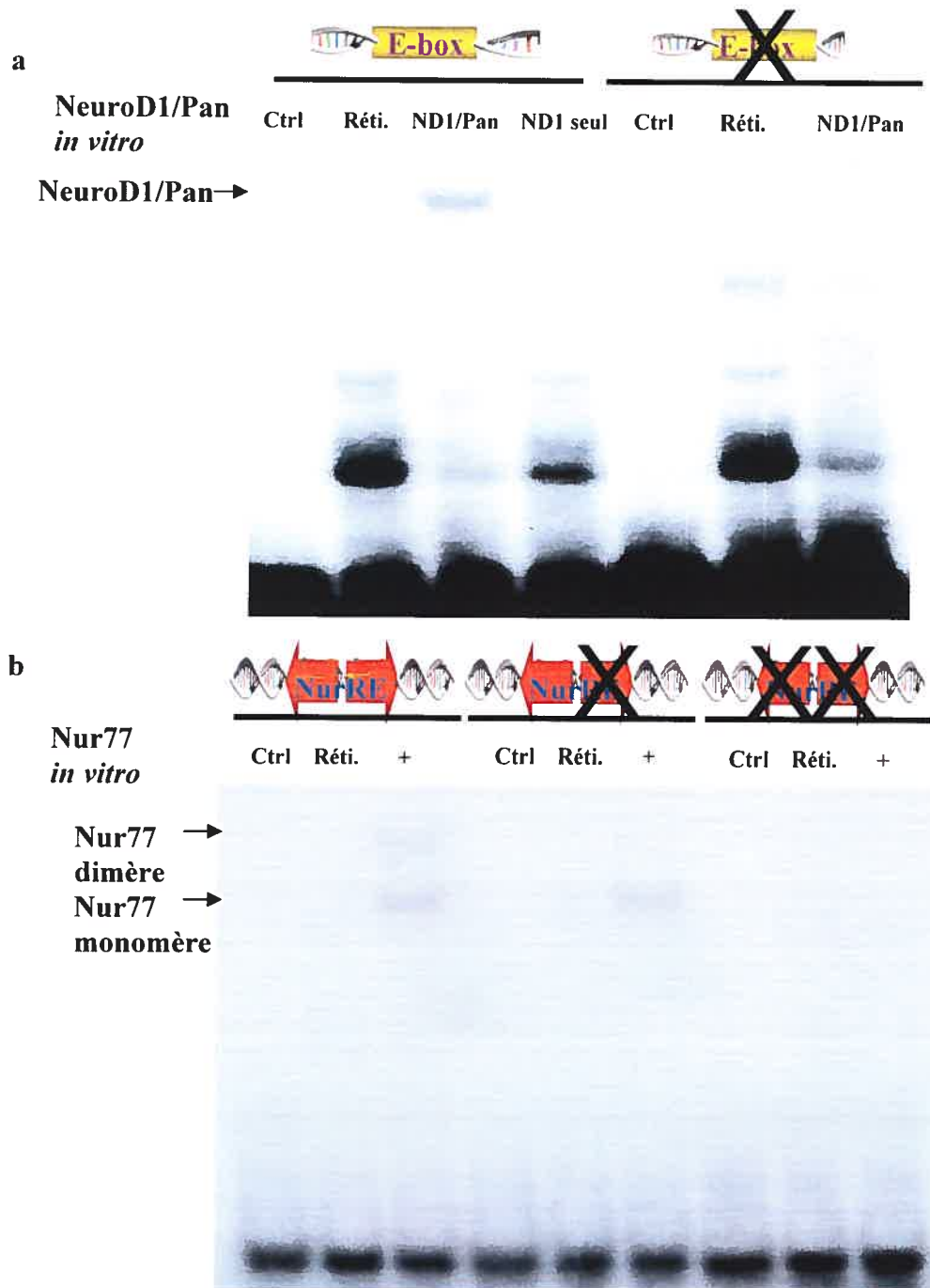


Figure 3.2: Étude de liaison pour NeuroD1 et Nur77 sur leur élément de réponse respectifs intact vs muté. (a) L'hétérodimère de bHLHs NeuroD1/Pan1 ne lie plus son élément de réponse, la boîte E_{neuro} , lorsque celle-ci est mutée. **(b)** La mutation d'un demi-site du NurRE ne permet que la liaison en monomère, tandis que la double mutation abolie complètement la liaison de Nur77 (aussi appelé NGFI-B) au NurRE. (Ctrl: Contrôle. Réti: Réticulocytes seuls).

3.2.2 Les mutations n'entraînent pas d'interférence fonctionnelle entre les parties distale et centrale du promoteur POMC

Après avoir vérifié que les mutations introduites au sein de chacun des éléments de réponse abolissaient la liaison de leurs facteurs respectifs, nous avons voulu nous assurer que ces mutations n'entraînaient pas d'interférence fonctionnelle entre les parties du promoteur. En effet, comme il existe une synergie entre les domaines distale (DE2C) (144) et centrale (CE3) (83) du promoteur POMC, il était important que la mutation d'un des deux sites ne nuise pas à l'activité transcriptionnelle de l'autre qui demeure intact. Afin de procéder à cette vérification, j'ai transfecté les rapporteurs intacts et mutés pour chacun des sites dans les cellules HEK293 avec une quantité des vecteurs d'expression Tpit, Nur77 ou NeuroD1. Comme ces cellules expriment déjà des niveaux endogènes de Pitx1 et Pan1, ces facteurs n'ont pas été ajoutés. Cette étude fut au départ entreprise avec des constructions où les 500 pb du promoteur POMC complet (intact, boîte E_{neuro} mutée ou NurRE muté) y étaient clonées. Cependant, les résultats obtenus ne furent pas concluants : les activations suite aux surexpressions des différents facteurs étaient faibles et peu reproductibles. Nous avons donc opté pour l'utilisation des rapporteurs multimérisés. Afin d'avoir une activité transcriptionnelle significative, j'ai cloné le DE2C (contenant la boîte E_{neuro} mutée ou bien le NurRE muté à ces deux demi-sites) en dimère en amont du CE3 (site de liaison pour Tpit/Pitx) trimérisé. Ainsi, nous pouvions recréer la synergie entre les parties du promoteur et vérifier que les mutations n'entraînaient pas d'interférence fonctionnelle.

À la figure 3.3, nous pouvons voir que la surexpression de Tpit seul ne rehausse que faiblement l'activité transcriptionnelle des rapporteurs utilisés. Il en est de même lorsque l'on surexprime Nur77 ou NeuroD1 individuellement de Tpit (85;149;260). Par contre, en présence de Tpit et Nur77 (NGFI-B) ou bien de Tpit et NeuroD1 (figure 3.3a), l'interaction entre les parties distale et centrale du promoteur POMC est possible, permettant ainsi le rehaussement de l'activité transcriptionnelle. D'un autre côté, lorsqu'on surexprime Tpit et Nur77, l'activité transcriptionnelle du rapporteur boîte E_{neuro} mutée (figure 3.3b) est comparable à l'activité du promoteur multimérisé intact (figure 3.3a). Par contre, on perd cette activité lorsqu'on surexprime Tpit avec NeuroD1 (figure 3.3b). Inversement, sur le rapporteur contenant la double mutation du NurRE (voir figure

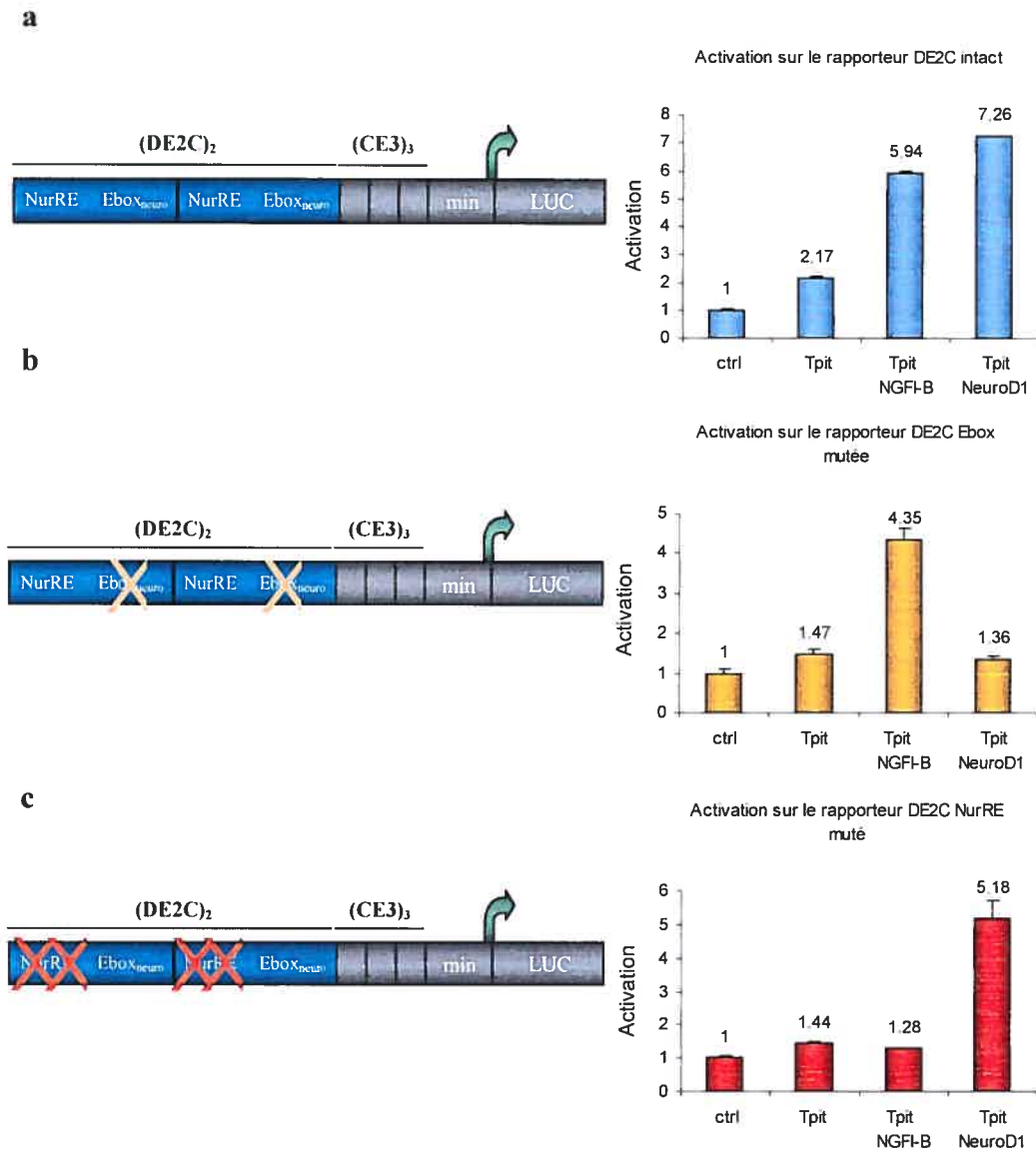


Figure 3.3: Vérification de la spécificité des mutations en transfection. Pour chacun des rapporteurs transfectés (**a**, **b**, **c**), une dose de 75 ng de RSV-Tpit, 150 ng de pCMX-Nur77 (NGFI-B) ou 150 ng du bHLH NeuroD1 fut ajoutée. La synergie est recréée sur le rapporteur intact, tandis que les mutations ne permettent plus l'activation, sans toutefois générer d'interférence fonctionnelle entre les parties distale et centrale du promoteur POMC. Les transfections ont été effectuées dans les cellules HEK293 qui expriment des niveaux endogènes de Pitx1 et Pan1. Les résultats sont représentés en terme d'activation par rapport à la valeur contrôle (placée arbitrairement à 1) et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

3.3c), l'activité suite à la surexpression de *Tpit* et *NeuroD1* est semblable à celle obtenue sur le promoteur multimérisé intact (figure 3.3a). En surexprimant *Tpit* et *Nur77*, cette activité sur le rapporteur *NurRE* muté est perdue (figure 3.3c). Ainsi, nous pouvons conclure que les mutations introduites sont spécifiques et n'entraînent pas d'interférence fonctionnelle entre les parties distale et centrale du promoteur POMC.

3.3 Production des souris transgéniques et mise au point des paramètres nécessaires aux analyses qualitatives et quantitatives

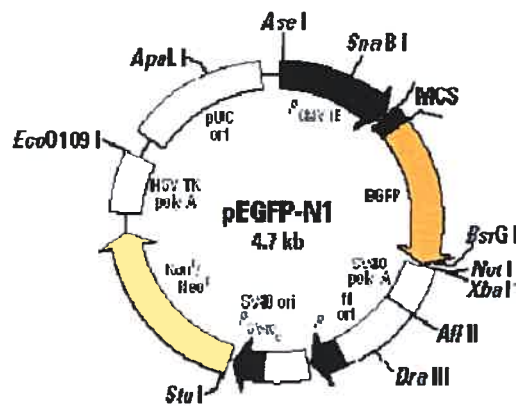
3.3.1 L'expression EGFP au cours du développement est restreinte aux cellules POMC⁺ chez les souris pPOMC-EGFP intact

Une fois la spécificité des mutations vérifiée, j'ai procédé à la production de lignées stables de souris transgéniques exprimant la EGFP sous contrôle du promoteur POMC (figure 3.4a et b). Avant d'entreprendre ce travail pour les constructions où le promoteur est muté (boîte *E_{neuro}* ou *NurRE*), des souris transgéniques pour lesquelles le promoteur POMC est intact ont servi à la mise au point entourant l'analyse qualitative et quantitative de l'expression EGFP. Suite à la première micro-injection, un seul fondateur sur un total de 5 exprimait le transgène. J'ai donc débuté avec l'analyse qualitative par immunofluorescence pour l'expression du transgène EGFP au cours du développement hypophysaire de cette lignée porteuse du promoteur POMC intact (pPOMC-EGFP intact). La figure 3.5 montre l'expression du transgène EGFP (a, b, c), l'expression de la POMC endogène (d, e, f) et la colocalisation des deux signaux (g, h, i) au cours du développement de l'hypophyse de même que chez l'adulte (la glande adulte n'est représentée qu'en partie). Les lobes postérieur (LP), antérieur (LA) et intermédiaire (LI) sont identifiés. Le lobe intermédiaire n'est pas présent à E14.5, puisqu'il ne se développe que vers E15.5.

3.3.2 Détection du signal EGFP par immunobuvardage de type Western

Étant donné que la lignée pPOMC-EGFP intact exprimait la EGFP dans les cellules POMC⁺ de l'hypophyse (corticotropes et mélanotropes), j'ai poursuivi avec la détection du transgène par immunobuvardage de type Western (Western blot). Afin d'évaluer l'anticorps α -EGFP dont nous disposions, j'ai effectué une gamme de dilutions

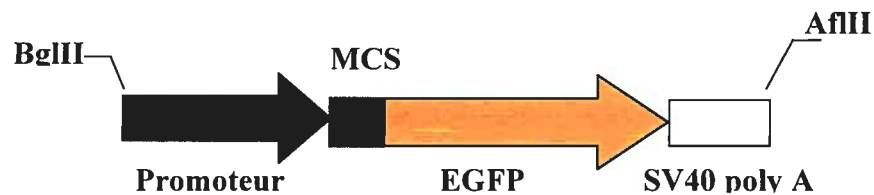
a



P_{CMV} remplacé par:

- pPOMC intact
- pPOMC avec Ebox_{neuro} mutée
- pPOMC avec NurRE muté

Fragment injecté: BglIII / AflIII



b

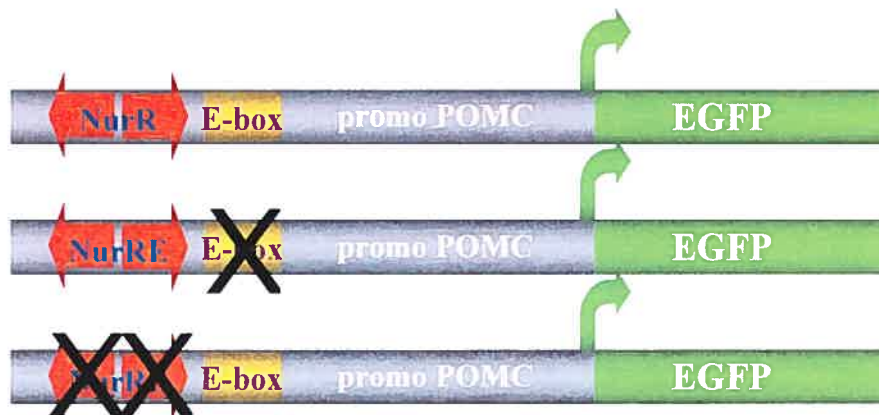


Figure 3.4: Construction des transgènes et représentation des fragments de micro-injection. (a) La construction des trois transgènes fut effectuée à partir du plasmide EGFP-N1 (Clontech). Le promoteur CMV fut remplacé par: pPOMC intact, pPOMC boîte E_{neuro} mutée ou pPOMC NurRE muté. Le fragment injecté contient le gène rapporteur EGFP (suivi de la queue polyA) sous contrôle des différents promoteurs (voir le matériel et méthodes pour plus de détails). (b) Représentation schématisée de chacun des fragments micro-injectés ayant été utilisé pour la génération des lignées stables de souris transgéniques.

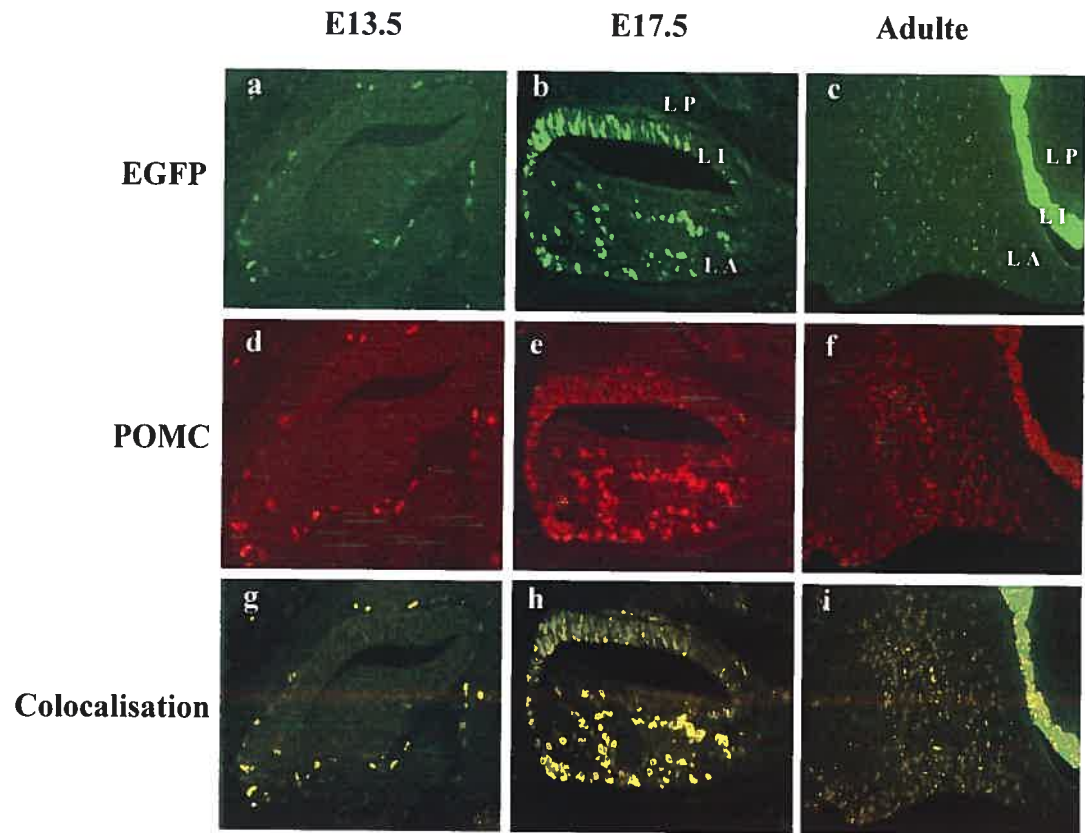


Figure 3.5: L'expression EGFP au cours du développement hypophysaire est restreinte aux cellules POMC⁺ chez les souris pPOMC-EGFP intact. L'analyse qualitative nous montre, par immunofluorescence, l'expression du transgène EGFP (a, b, c), de la POMC endogène (d, e, f) ainsi que la colocalisation des deux signaux (g, h, i) au cours du développement hypophysaire de même que chez l'adulte (la glande adulte n'est représentée qu'en partie). Les lobes postérieur (LP), antérieur (LA) et intermédiaire (LI) sont identifiés. Le lobe intermédiaire n'est pas présent à E14.5, puisqu'il ne se développe que vers E15.5.

d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse de souris adulte de la lignée pPOMC-EGFP intact dans un total de 25 µg d'extraits totaux d'une hypophyse sauvage (WT) (figure 3.6a). J'ai utilisé Tpit comme contrôle de chargement, puisque ce facteur n'est pas soumis à une régulation hormonale et par conséquent, ne varie pas en quantité. Comme nous pouvons le constater à la figure 3.6a, l'anticorps chèvre dirigé contre la EGFP est spécifique et sensible, puisque que la détection par chemiluminescence est possible jusqu'à une dilution du signal EGFP d'environ 1000 fois.

Comme nous voulions quantifier de façon précise l'expression de la EGFP en protéine, nous avons opté pour la révélation à l'aide de l'appareil Odyssey. Grâce à ce système, nous allions pouvoir obtenir des valeurs numériques correspondant à l'intensité de fluorescence émise pour chacun des signaux (démontré à la figure 3.8). Avant d'entreprendre la quantification, j'ai effectué une gamme de dilutions d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse de souris adulte de la lignée pPOMC-EGFP intact. Cette étape a permis de s'assurer que l'anticorps secondaire (α -chèvre IRdye800) nous permettait d'obtenir un signal suffisant pour la détection par l'Odyssey (figure 3.6b). Encore une fois, Tpit a servi de contrôle de chargement.

3.3.3 Détection et quantification du signal EGFP aux différents stades embryonnaires du développement hypophysaire

L'objectif du projet étant de vérifier l'importance de la boîte E_{neuro} et du NurRE au cours du développement hypophysaire, j'ai mis au point les paramètres de détection et de quantification de l'expression de la EGFP à différents stades du développement à l'aide de la lignée promoteur POMC intact. À la figure 3.7a, 25 µg d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse transgénique embryonnaire au jour E17.5 fut déposé sur gel SDS-PAGE. Comme nous pouvons le voir sur la figure, la détection de la EGFP par immunobuvardage de type Western est toujours possible à l'aide de l'anticorps α -EGFP précédemment utilisé pour l'analyse chez l'adulte (à la figure 3.6). À un temps plus précoce du développement, à E13.5, la dissection est plus laborieuse, mais tout de même possible et la quantification du signal EGFP se fait suite à la RT-QPCR. Comme le montre la figure 3.7b, le messenger EGFP est amplifié de façon significative. La courbe d'amplification pour Tpit sert à la normalisation de l'expression EGFP.

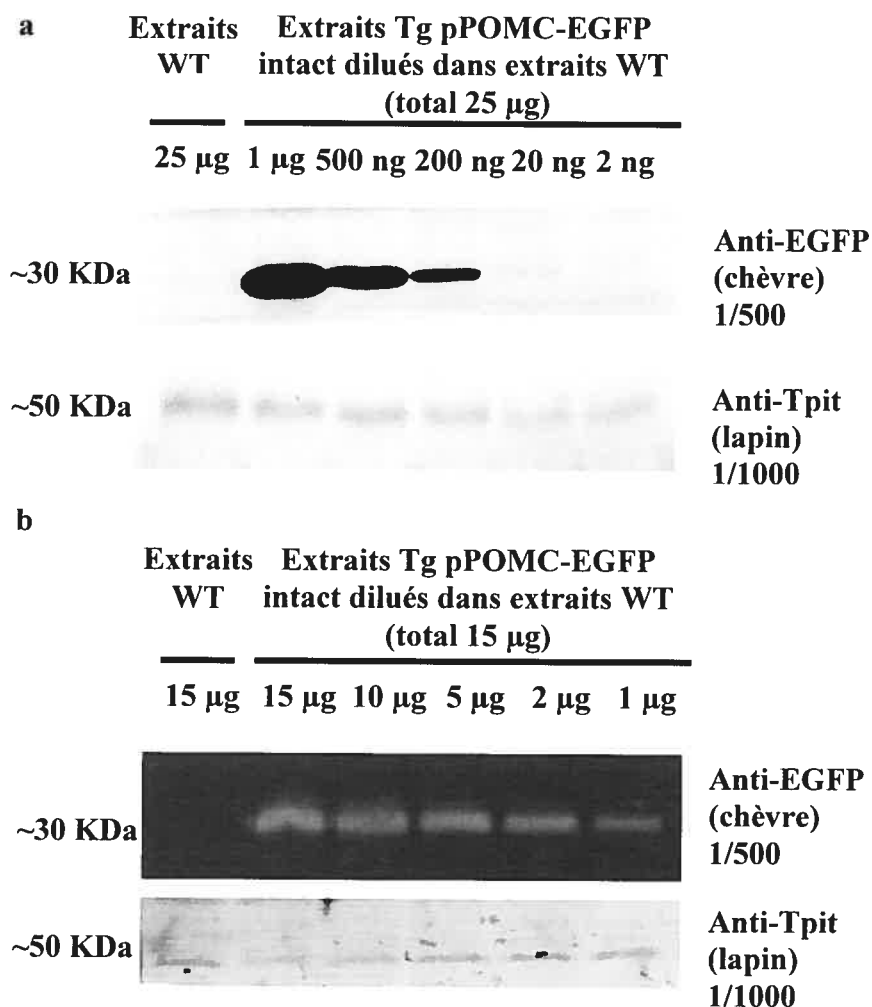


Figure 3.6: Les niveaux d'expression de EGFP permettent la détection par immunobuvardage de type Western (Western blot). Gamme de dilutions d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse de souris adulte transgénique (Tg) de la lignée pPOMC-EGFP intact dans un total de 25 µg (**a**) ou 15 µg (**b**) d'extraits protéiques totaux d'une hypophyse sauvage (WT). La première piste de (**a**) et (**b**) ne contient que respectivement 25 µg ou 15 µg d'extraits hypophysaires sauvages sans extrait hypophysaire transgénique. La révélation a été effectuée par chemiluminescence (ECL) (en **a**) et par fluorescence à l'aide du système Odyssey (en **b**). Tpit a servi de contrôle de chargement dans les deux cas.

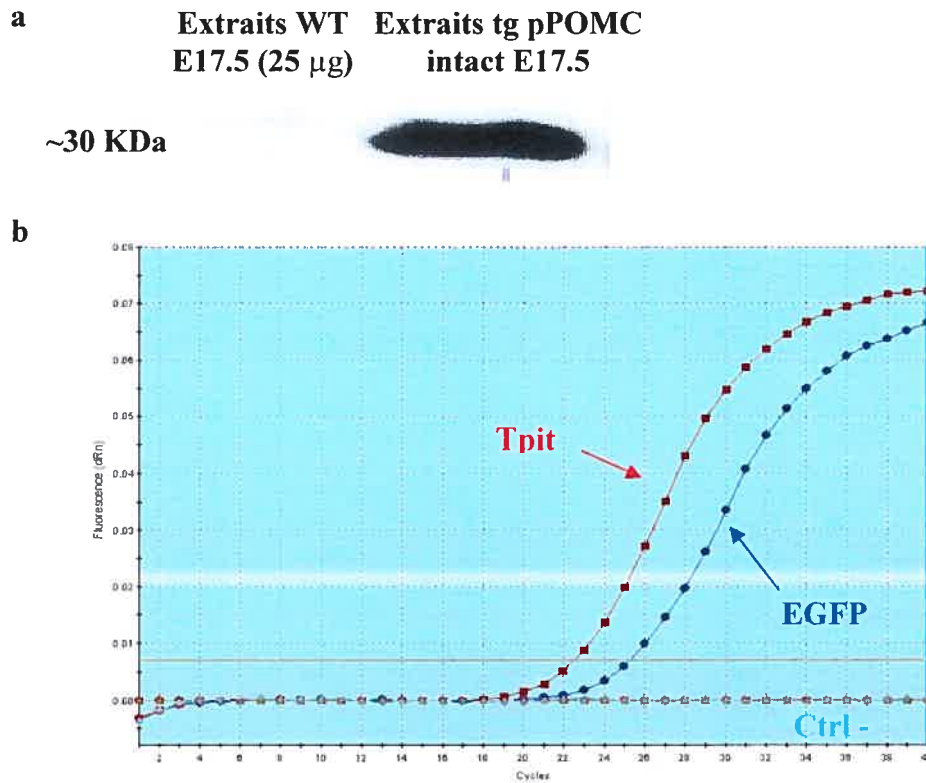


Figure 3.7: La détection et la quantification de la EGFP sont possibles aux différents stades embryonnaires du développement. (a) La détection du signal EGFP est possible par immunobuvardage de type Western sur 25 µg d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse transgénique embryonnaire au jour E17.5. **(b)** Quantification par RT-QPCR du messenger EGFP provenant d'une hypophyse transgénique embryonnaire au jour E13.5. Le contrôle négatif (ctrl-) résulte d'une RT-QPCR à partir d'une hypophyse sauvage. La courbe d'amplification Tpit sert à la normalisation de l'expression EGFP.

3.4 Analyses quantitative et qualitative de l'expression EGFP pour les lignées promoteurs boîte E_{neuro} mutée et NurRE muté

3.4.1 Production des lignées transgéniques stables pPOMC-EGFP boîte E_{neuro} mutée ou NurRE muté

Après avoir mis au point les différents paramètres qualitatifs et quantitatifs d'expression du transgène EGFP à partir de la lignée promoteur POMC-EGFP intact, j'ai procédé à la production de lignées stables de souris transgéniques mutées pour la boîte E_{neuro} ou pour le NurRE (voir la figure 3.4a et b). Comme une seule lignée promoteur POMC-EGFP intact exprimait le transgène jusqu'à ce moment, j'ai généré d'autres lignées de ce type afin de permettre une éventuelle analyse statistique des résultats. La caractérisation des lignées pour chaque transgène par Southern blot révéla de 2 à 10 copies/génome pour les lignées promoteur POMC intact, 2 à 15 copies/génome pour les lignées boîte E_{neuro} mutée ainsi que 2 à 25 copies/génome pour les lignées NurRE muté (résultats non montrés).

3.4.2 Quantification de l'expression du transgène EGFP en protéine par le système Odyssey

Étant donné que l'anticorps EGFP était spécifique et donnait un signal suffisant pour sa détection, il fut utilisé pour détecter et quantifier l'expression du transgène EGFP chez l'adulte pour une souris dont le promoteur POMC-EGFP comportait une mutation de la boîte E_{neuro} . Pour les besoins de la quantification par le système Odyssey, une gamme de dilutions d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse de souris adulte de la lignée promoteur POMC-EGFP intact fut préparée dans un total de 15 μg d'extraits protéiques totaux d'une hypophyse sauvage (figure 3.8 pistes 2, 3, 4, 6 et 7). À la piste 5, j'ai déposé 15 μg d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse de souris adulte pPOMC-EGFP boîte E_{neuro} mutée. Après révélation et quantification de la fluorescence par le système Odyssey, on ne constate aucun signal quantifiable en protéine pour cette lignée mutée (figure 3.8 piste 5). Comme à l'habitude, Tpit fut utilisé à titre de contrôle de chargement.

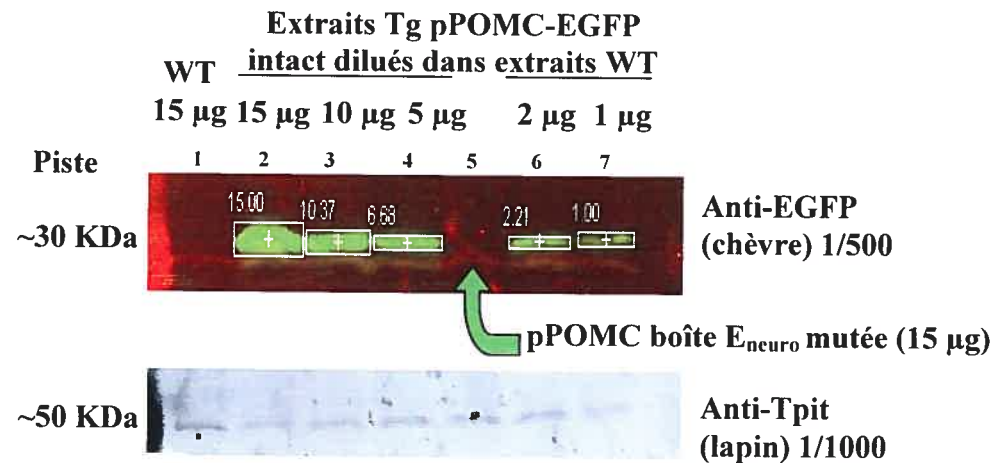


Figure 3.8: Quantification de l'expression du transgène EGFP en protéine par le système Odyssey. Gamme de dilutions d'extraits protéiques totaux provenant d'une hypophyse de souris adulte transgénique (Tg) de la lignée pPOMC-EGFP intact (pistes 2, 3, 4, 6 et 7) dans un total de 15 μ g d'extraits protéiques totaux d'une hypophyse sauvage (WT). La première piste ne contient que 15 μ g d'extraits totaux hypophysaires sauvages. La piste 5 contient 15 μ g d'extraits totaux d'une hypophyse adulte de la lignée pPOMC boîte E_{neuro} mutée. La révélation ainsi que la quantification ont été effectuées par fluorescence à l'aide du système Odyssey. Tpit a servi de contrôle de chargement. (Se référer au matériel et méthodes pour plus de détails).

L'immunobuvardage couplé à la révélation par le système Odyssey ne permet pas la détection ainsi que la quantification de l'expression EGFP chez l'adulte pour la lignée promoteur POMC-EGFP boîte E_{neuro} mutée (expression sous le seuil de détection). Comme nous n'avions aucune certitude au sujet des niveaux d'expression potentiels chez les embryons, nous avons opté pour la quantification de l'expression EGFP par RT-QPCR pour les lignées intactes et mutées. Les tests d'expression aux différentes étapes du développement embryonnaires furent aussi effectués par RT-QPCR.

3.4.3 Quantification par RT-QPCR de l'expression du transgène EGFP au cours du développement hypophysaire

Afin de connaître précisément l'importance *in vivo* de chacun des sites (boîte E_{neuro} et NurRE) au cours du développement hypophysaire, j'ai procédé à la quantification du signal EGFP par RT-QPCR. Suite à la deuxième micro-injection, plusieurs lignées positives pour l'expression EGFP ont été obtenues. Les différentes valeurs moyennes d'expression EGFP obtenues chez l'adulte par RT-QPCR pour chacune des lignées sont représentées au tableau I. Celles-ci sont calculées en pourcentage d'expression EGFP par rapport à la lignée pPOMC-EGFP intact 862. Puisque cette lignée a été utilisée pour la mise au point des différents paramètres qualitatif et quantitatif, elle fut aussi considérée comme lignée de référence. Le tableau I indique aussi le nombre de souris analysées par lignée. Trois lignées stables par transgène (promoteur intact, boîte E_{neuro} mutée ou NurRE muté) exprimant la EGFP ont été conservées pour les fins de l'analyse d'expression au cours du développement. Les numéros des lignées conservées sont présentés aux figures 3.9 et 3.10.

La figure 3.9 montre les résultats obtenus pour chacune des lignées des trois différents transgènes sous forme de pourcentage d'expression par rapport à la lignée promoteur POMC-EGFP intact 862 à E14.5 (figure 3.9a), à E17.5 (figure 3.9b), de même que chez l'adulte (voir figure 3.9c). Pour chaque transgène (pPOMC intact, boîte E_{neuro} mutée et NurRE muté), la moyenne d'expression EGFP pour les trois lignées est représentée par la bande hachurée. Les variations entre les niveaux d'expression au sein des lignées pour un même transgène sont dues à l'intégration de ce dernier dans des régions chromosomiques différentes, affectant ainsi les niveaux de transcription du gène




Transgène	Lignée	Nombre de souris analysées	Pourcentage moyen d'expression EGFP
	862	12	100
	833	3	78
	846	3	48
	843	3	12
	870	3	0.3
	880	3	1.2
	914	4	0.4
	940	2	0.4
	103	5	0.5
	108	3	0.3
	113	3	1.4
	132	3	0.4

Tableau I: Représentation du pourcentage moyen d'expression EGFP (par rapport à la lignée pPOMC-EGFP intact 862) pour chaque lignée de chacun des transgènes chez l'adulte. Les valeurs d'expression EGFP ont été obtenues par RT-QPCR et furent normalisées par l'ARNr 40S.

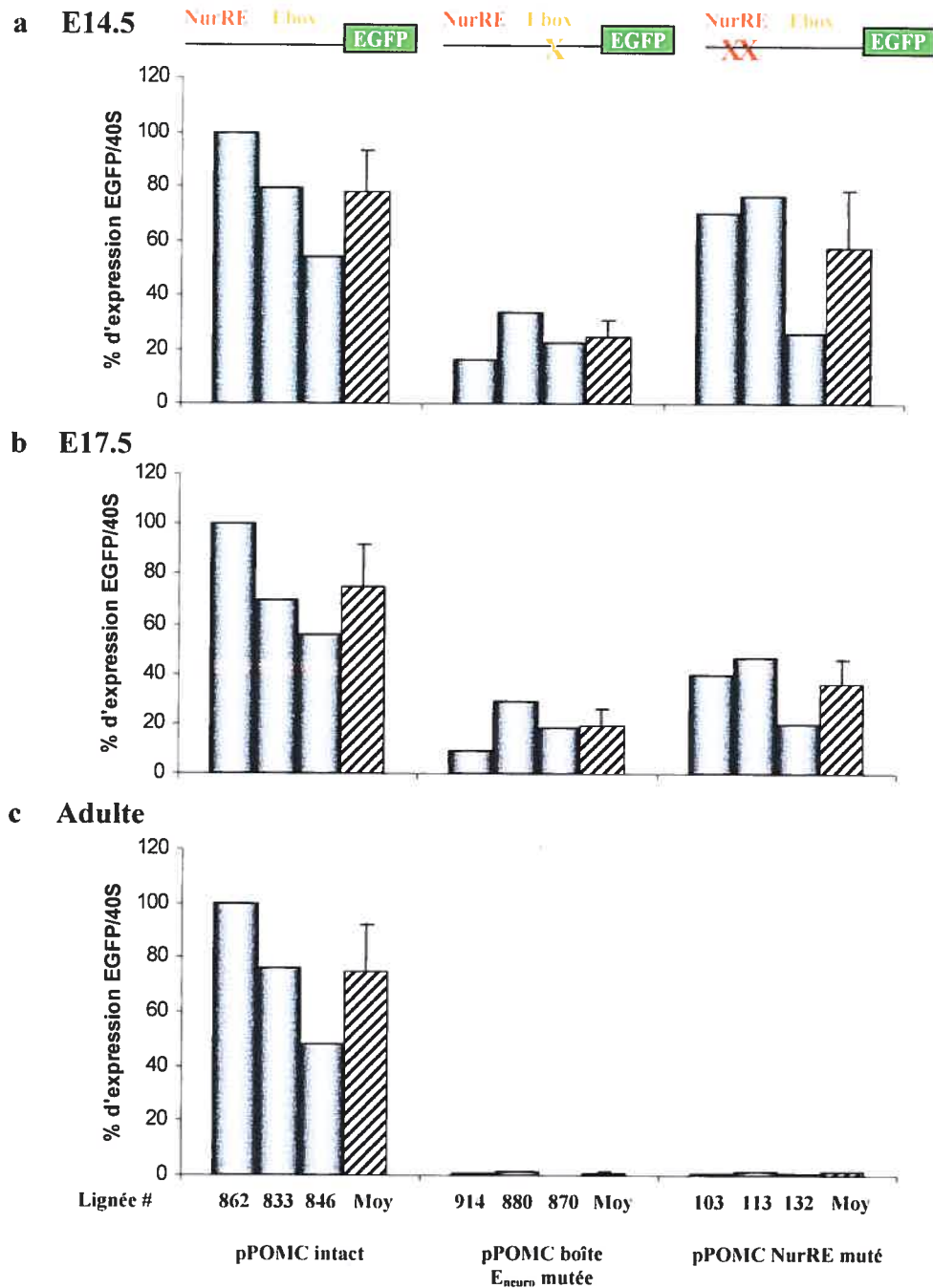


Figure 3.9: Quantification par RT-QPCR de l'expression du transgène EGFP (pPOMC intact vs muté) au cours du développement hypophysaire. (a) Pourcentage d'expression EGFP (par rapport au pPOMC intact) de trois lignées pour chacun des trois transgènes (pPOMC-EGFP intact, boîte E_{neuro} mutée ou NurRE muté) au temps E14.5. **(b)** Idem qu'en (a), mais au temps E17.5. **(c)** Idem qu'en (a), mais au temps adulte. Les bandes hachurées représentent les moyennes (Moy) d'expression EGFP des trois lignées pour chaque transgène. Les numéros des lignées utilisées sont indiqués au bas de la figure. L'expression EGFP fut normalisée par l'ARNr 40S.

rapporteur. Étant donné que l'analyse de l'expression EGFP par RT-QPCR au cours du développement a montré que Tpit varie selon le stade développemental, la normalisation fut effectuée à partir de l'ARNr 40S.

En comparant les moyennes d'expression du transgène EGFP à E14.5 (figure 3.9a), on peut voir que la mutation de la boîte E_{neuro} affecte l'expression EGFP tel que montré par le pourcentage d'expression résiduel aux alentours des 30%. D'un autre côté, la mutation du NurRE semble toujours permettre un niveau significatif d'expression. À E17.5, les pourcentages résiduels d'activité chez les mutants boîte E_{neuro} et NurRE sont respectivement d'environ 20% et 40% (figure 3.9b). Finalement, comme nous pouvons l'observer à la figure 3.9c, la mutation (boîte E_{neuro} ou NurRE) des promoteurs entraîne une absence d'expression du transgène EGFP chez l'adulte comparativement au promoteur intact.

3.4.4 Profils d'expression du transgène EGFP sous contrôle des promoteurs POMC intact, boîte E_{neuro} mutée ou NurRE muté

La figure 3.10 montre le corollaire de l'analyse qualitative d'expression du transgène EGFP par immunofluorescence pour les promoteurs POMC-EGFP intact, boîte E_{neuro} mutée et NurRE muté. En 3.10a, c et e, j'ai représenté graphiquement le rapport (en pourcentage) du nombre de cellules EGFP sur le nombre de cellules ACTH (en faisant la moyenne de trois comptes) à E14.5 (figure 3.10a), à E17.5 (figure 3.10c) ainsi que chez l'adulte (figure 3.10e) pour chacun des transgènes représentés au haut de la figure 3.10b. Les immunofluorescences obtenues en 3.10b, d et f montrent l'expression du transgène EGFP, de la POMC endogène (révélée par la détection de l'ACTH) ainsi que la colocalisation des deux signaux au temps E14.5 (figure 3.10b), E17.5 (figure 3.10d) et chez l'adulte (figure 3.10f, la glande adulte n'est représentée qu'en partie) pour les promoteurs POMC intact, boîte E_{neuro} mutée et NurRE muté. La comparaison qualitative entre les niveaux d'expression des différents transgènes peut être ainsi obtenue à chacun des temps de l'étude. Les grossissements aux figures 3.10b, d et f montrent la colocalisation (de couleur jaune) des signaux EGFP et ACTH pour quelques cellules des trois transgènes à chacun des stades du développement hypophysaire.

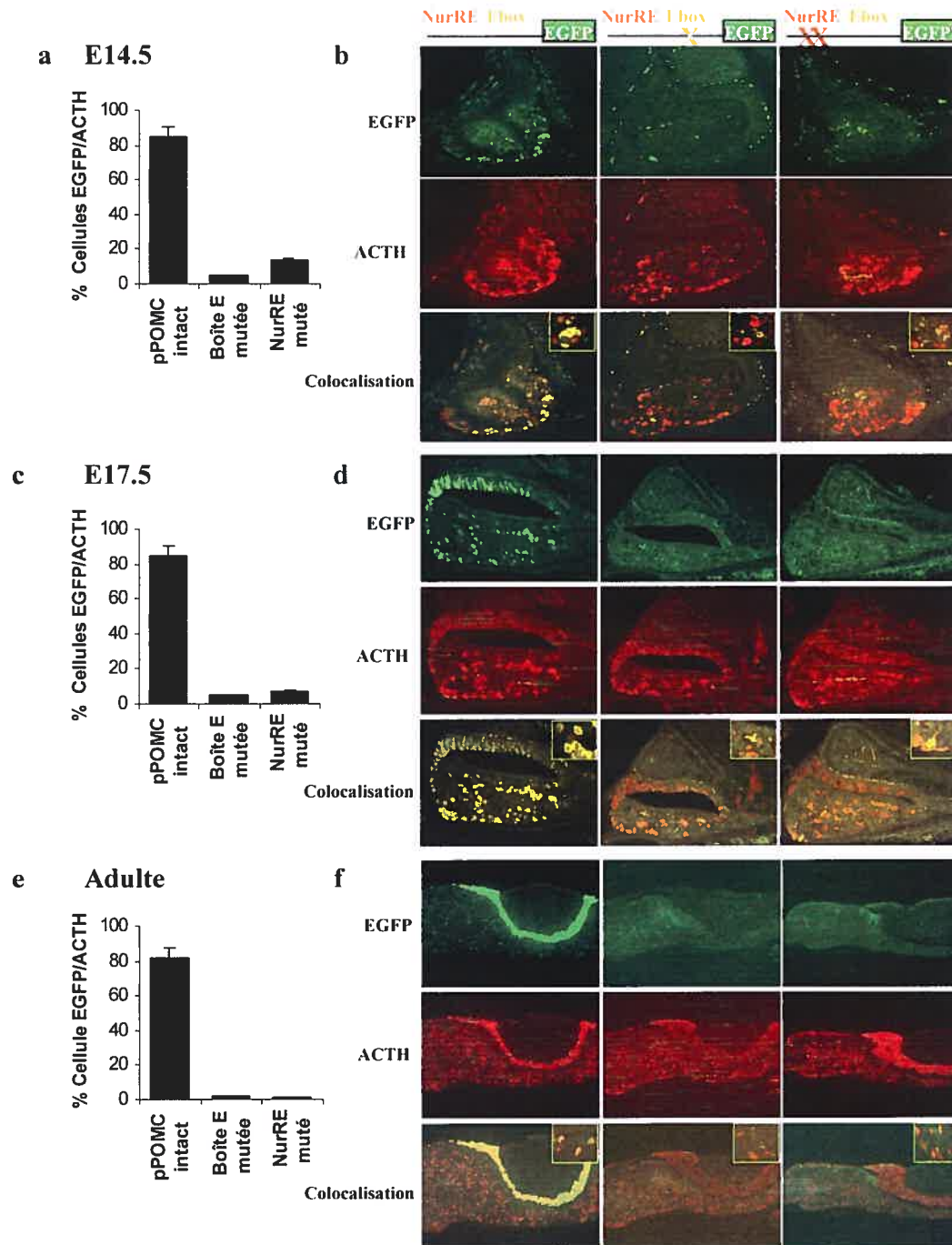


Figure 3.10: Profils d'expression au cours du développement hypophysaire du transgène EGFP (promoteur POMC intact vs muté), de POMC (ACTH) et colocalisation. (a) Rapport (en %) du nombre de cellules EGFP sur ACTH pour le promoteur POMC intact (lignée 862), boîte E_{neuro} mutée (lignée 914) et NurRE muté (lignée 113). **(b)** Profils d'expression (EGFP, ACTH et colocalisation) à E14.5 pour le promoteur POMC intact vs boîte E_{neuro} mutée ou NurRE muté. **(c)** Idem qu'en (a), mais à E17.5. **(d)** Idem qu'en (b), mais à E17.5. **(e)** Idem qu'en (a), mais au temps adulte. **(f)** Idem qu'en (b), mais au temps adulte. Le temps adulte ne montre qu'une partie de la glande. Chaque colocalisation est montrée en agrandissement.

La quasi-totalité des cellules ACTH de la lignée promoteur POMC-EGFP intact est EGFP positives pour chacun des temps du développement et ce, dans les lobes antérieur et intermédiaire (le lobe intermédiaire n'est présent qu'aux alentours du stade E15.5). D'un autre côté, très peu de cellules du lobe antérieur expriment le transgène EGFP lorsqu'il est contrôlé par le promoteur boîte E_{neuro} mutée à E14.5, E17.5 de même que chez l'adulte. De plus, l'expression y est complètement perdue dans le lobe intermédiaire (figure 3.10d et f). Quelques cellules de l'adénohypophyse émettent un signal EGFP à E14.5 pour le transgène sous contrôle du promoteur POMC-EGFP NurRE muté. Par contre, le signal dans le lobe antérieur diminue drastiquement et devient absent du lobe intermédiaire à E17.5. Tout comme pour le transgène boîte E_{neuro} mutée, l'expression résiduelle est presque nulle dans chaque lobe de l'hypophyse adulte NurRE muté.

3.5 Conclusion

En conclusion, le nouvel anticorps contre NeuroD1 a permis de confirmer, en immunohistochimie, que ce facteur possède une cinétique d'expression décroissante au cours du développement hypophysaire. D'un autre côté, même si le profil d'expression de Nur77 semblait invariable (à partir des résultats obtenus avec l'anticorps Nurrl), il n'en demeurerait pas moins un candidat potentiel de remplacement de NeuroD1 dans le maintien de l'expression histo-spécifique du gène POMC. Afin de vérifier les hypothèses de travail, la production de souris transgéniques exprimant le transgène pPOMC-EGFP fut entreprise suite à l'obtention des promoteurs POMC comportant des mutations spécifiques pour les éléments de réponses de NeuroD1 et de Nur77.

Après la mise au point des paramètres nécessaires aux analyses quantitatives et qualitatives, l'expression EGFP des trois transgènes produits fut visualisée par immunofluorescence ainsi que quantifiée par RT-QPCR aux différents stades du développement. Ces analyses ont permis de démontrer l'importance relative *in vivo* de chacun des sites (boîte E_{neuro} et NurRE) dans la régulation développementale de l'expression hypophysaire du gène POMC.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 Cinétique d'expression de NeuroD1 et Nur77

Le bHLH NeuroD1 est un activateur spécifique de la transcription du gène POMC (84). Son expression au sein des cellules ACTH⁺ (84) précède de peu l'apparition de POMC au jour embryonnaire 12.5 du développement hypophysaire murin (84;149), lui imputant donc un rôle possible dans la différenciation corticotrope. Ce rôle fut d'ailleurs mis en évidence par l'étude des souris ayant subies l'ablation du gène NeuroD1. Comme il fut précédemment publié (149), le phénotype hypophysaire associé à ces souris est un retard dans la différenciation corticotrope précoce (vers E13.5) qui est compensé de façon tardive (vers E16.5). Ce retard dans la différenciation corticotrope est soutenu par le délai dans l'expression de POMC. Malgré son arrivée précoce, NeuroD1 montre une expression transitoire au niveau de l'hypophyse entre les jours 12 et 15 du développement murin (84) qui coïncide avec le délai dans l'apparition des corticotropes chez la souris NeuroD1^{-/-}. Les résultats obtenus à la figure 3.1a, b, c et d, de même qu'une publication antérieure (84), montrent que l'expression de NeuroD1 diminue effectivement vers les jours E15-16 du développement pour devenir très faibles chez l'adulte. Cette expression résiduelle chez l'adulte semble être en partie cytoplasmique (figure 3.1d).

En ce qui concerne la localisation intracellulaire de NeuroD1, la littérature indique que la phosphorylation de ce facteur régule sa localisation subcellulaire dans les cellules β du pancréas. En effet, il semble qu'une stimulation de ces cellules par le glucose influence la proportion cytoplasmique de NeuroD1 par un mécanisme impliquant la voie de signalisation MAPK (261). Avec l'établissement de l'axe HPA vers E15-16 du développement, la circulation sanguine qui atteint l'hypophyse permet à celle-ci d'être en contact avec différentes molécules, comme le CRH hypothalamique par exemple. Puisque le CRH active la voie MAPK suite à sa liaison aux récepteurs des corticotropes (180), nous pourrions avoir un mécanisme semblable de relocalisation cellulaire pour NeuroD1 dans ces cellules. La relocalisation cytoplasmique de NeuroD1 finirait par atteindre une proportion relative plus élevée chez l'adulte, telle que montré à la figure 3.1d.

La chute d'expression de NeuroD1 coïncide avec l'établissement du système porte hypothalamo-hypophysaire. À ce moment, plusieurs facteurs se retrouvent induits dans les cellules corticotropes lorsque celles-ci commencent à recevoir des signaux CRH émanants de l'hypothalamus (177;262). Un de ces facteurs induits, le récepteur nucléaire orphelin Nur77, vient lier l'ADN à son élément de réponse, le NurRE, situé à seulement 5 paires de bases du site de liaison de NeuroD1, la boîte E_{neuro} . Étant donné ces indices spatio-temporels, j'ai voulu vérifier si Nur77 montrait un patron d'expression qui serait en accord avec un rôle potentiel de remplacement de NeuroD1 dans le maintien de l'expression de POMC. L'analyse par immunohistochimie de l'expression de Nurr1, un membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins qui montre une distribution comparable à celle de Nur77 (259), ne révèle cependant pas la présence d'un signal augmenté aux alentours de E16 (figure 3.1e, f, g, h). En effet, cette classe de facteurs semble conserver une expression stable et ubiquitaire au sein du tissu neural ainsi que dans l'hypophyse au cours du développement de même que chez l'adulte.

4.2 Analyses quantitative et qualitative de l'expression EGFP *in vivo* pour les lignées porteuses d'un promoteur POMC muté

Après avoir procédé à la production de mutations spécifiques pour chacun des sites à l'étude, à l'établissement de lignées transgéniques pPOMC-EGFP intact et muté, ainsi qu'à la mise au point des paramètres nécessaires aux analyses qualitatives et quantitatives, j'ai pu enfin obtenir les résultats relatifs à l'importance *in vivo* des sites NurRE et boîte E_{neuro} au cours du développement hypophysaire.

La très faible expression EGFP à E14.5 chez le mutant boîte E_{neuro} révèle que cet élément de réponse est important pour l'expression POMC de façon précoce. Ce résultat concorde avec la forte expression de NeuroD1 à E14.5 (figure 3.1a) ainsi qu'avec les données obtenues précédemment en cellules AtT-20 (84). Ces résultats antérieurs qui suggéraient que la boîte E_{neuro} était un élément essentiel du promoteur POMC sont donc confirmés par les données *in vivo*, tel que démontrées par le présent mémoire. Une approche *in vivo* avait déjà apporté des renseignements au sujet de l'importance de la boîte E_{neuro} de façon quantitative, mais ces données avaient été obtenues à l'aide de souris ayant le promoteur distal délété en entier (84). De plus, ces valeurs quantitatives

n'avaient été visualisées que chez l'adulte et non au cours du développement hypophysaire. Les valeurs obtenues à E14.5 montrent que le faible pourcentage d'expression EGFP par rapport à la lignée promoteur POMC intact 862 (figure 3.9a) se reflète qualitativement et quantitativement par un ratio très bas de cellules EGFP sur ACTH en immunofluorescence (figure 3.10a, b).

La boîte E_{neuro} possède une importance croissante, puisque l'expression EGFP relative se trouve diminuée davantage à E17.5 comparativement au temps E14.5 (figure 3.9b vs a). Ceci nous indique donc que la boîte E_{neuro} demeure importante même si NeuroD1 chute en expression, suggérant ainsi que le remplaçant potentiel permettant le maintien de l'expression POMC soit de nature bHLH. Encore une fois, les analyses qualitative et quantitative montrent qu'il ne reste qu'un faible pourcentage de cellules EGFP comparativement à la lignée pour laquelle le promoteur est intact (figure 3.10c, d). De plus, le signal EGFP est complètement éteint du lobe intermédiaire (figure 3.10d). Puisque les mélanotrope se différencient juste avant la chute d'expression de NeuroD1, que la mutation de la boîte E_{neuro} entraîne une extinction du signal EGFP du lobe intermédiaire et que NeuroD1 n'y est pas exprimé, l'implication d'un bHLH originant du lobe intermédiaire est à considérer. En effet, celui-ci pourrait venir prendre la relève de NeuroD1 au-delà de E15, permettant ainsi le maintien de l'expression POMC dans les corticotrope.

De son côté, l'expression EGFP associée au transgène NurRE muté diminue légèrement par rapport au transgène promoteur intact à E14.5 (figure 3.9a). Ce résultat est surprenant, puisque le système porte hypothalamo-hypophysaire n'est pas en place à ce stade. Comme Nur77 est fortement induit en réponse aux signaux CRH hypothalamiques (180), il était envisageable de penser que le site NurRE n'allait montrer une importance qu'aux alentours de E16, c'est-à-dire au moment où l'axe HPA devient fonctionnel et que l'hypophyse commence à recevoir des signaux en provenance de l'hypothalamus (177). Par contre, en tenant compte de la barre d'erreur, le pourcentage d'expression EGFP demeure près de la valeur moyenne obtenue pour le promoteur intact. En effet, puisque nous observons des variations parfois significatives entre les niveaux d'expression au sein des lignées pour un même transgène, il est possible d'obtenir des

écarts types plus élevés. Ces variations sont dues à l'intégration du transgène dans des régions chromosomiques différentes, affectant ainsi les niveaux de transcription du gène rapporteur. D'un autre côté, le ratio de cellules EGFP sur ACTH en immunofluorescence semble indiquer une diminution notable qualitative, lorsque comparé au promoteur intact (figure 3.10a, b). Par conséquent, nous pouvons donc prétendre que le site NurRE possède une importance relative à E14.5. Une explication possible de ce résultat pourrait être que cet élément de réponse possède un rôle potentiel à titre de point d'ancrage pour un mégacomplexe protéique nécessaire à la transcription de POMC. La perte de ce point d'ancrage entraînerait donc une diminution de la stabilité du complexe, résultant en une baisse d'expression.

De façon plus tardive, à E17.5, on observe à la figure 3.9b, que l'élément NurRE possède une importance plus considérable, tel que montré par une chute plus prononcée de l'expression EGFP. Étant donné que l'axe HPA se trouve fonctionnel depuis environ une journée et demie et qu'une induction de Nur77 s'en suit, le site NurRE se retrouve davantage sollicité. Ce résultat était prévisible, puisque l'action d'une stimulation CRH converge vers le NurRE comme cible principale du promoteur POMC (192). Concernant le point de vue qualitatif, le niveau d'expression EGFP moyen obtenu en QPCR pour les lignées NurRE muté (figure 3.9b), corrèle avec le faible signal EGFP observé en immunofluorescence dans l'hypophyse à E17.5 (figure 3.10c, d).

Un résultat intéressant vient de l'analyse de l'expression EGFP dans le lobe intermédiaire des hypophyses NurRE muté. En effet, le signal EGFP y est complètement éteint (figure 3.10d). Pourtant, les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire n'ont jamais été montrées comme étant capables de répondre à une stimulation CRH, probablement parce qu'elles ne possèdent pas le récepteur. Cependant, puisque l'expression EGFP est absente de ce lobe lorsque le NurRE est muté, il est raisonnable de penser que l'importance du NurRE relèverait soit de l'activité de facteurs Nur constitutivement actifs dans les mélanotropes ou d'une activation par d'autres signaux que le CRH. De plus, l'idée d'un rôle potentiel du NurRE à titre de site d'ancrage d'un mégacomplexe transcriptionnel, comme le stipule l'hypothèse formulée plus haut pour

tenter d'expliquer la diminution d'expression EGFP au sein des corticotropes à E14.5, pourrait être également à considérer dans le lobe intermédiaire.

Il est à noter que le site NurRE chevauche une partie de l'élément de réponse de STAT1/3 (237). La mutation du NurRE ayant servis à la production du transgène touche la partie 5' de ce site STAT1/3. Il fut démontré que la signalisation LIF joue un rôle en tant que modulateur paracrine ou autocrine dans la réponse au CRH et que l'expression de POMC, de même que la sécrétion d'ACTH induite par LIF, sont dépendantes de STAT1/3 dans les cellules AtT-20 (235). La mutation du NurRE touchant le site STAT1/3 serait donc également une hypothèse pour expliquer la diminution d'expression EGFP dans les corticotropes à E14.5, ainsi que l'absence d'expression dans le lobe intermédiaire à E17.5 pour les hypophyses NurRE muté.

Dans le même ordre d'idée, une publication récente suggère que l'élément NurRE/STAT du promoteur POMC serait la cible prédominante de la synergie CRH-LIF (263). La liaison à l'ADN des deux facteurs de transcription impliqués, Nur77 et STAT1/3, semble effectivement requise pour une synergie optimale (263). Les auteurs montrent que lors d'une stimulation LIF-CRH, l'activation de Nur77 et STAT1/3 permet la mobilisation du facteur CREB qui vient stabiliser leur liaison au promoteur POMC, tout en facilitant le recrutement de coactivateurs. La liaison de ces facteurs est abolie par les mutations appropriées. Les mutations utilisées dans cette publication ne sont cependant pas celles qui ont servis à la production des souris transgéniques pPOMC-EGFP NurRE muté.

Afin de vérifier si la liaison de STAT1/3 est affectée par la mutation du NurRE utilisée en transgénèse, nous pourrions procéder par étude de liaison (EMSA). À partir d'extraits de cellules AtT-20 stimulés par le LIF, permettant ainsi la forme activée du facteur STAT1/3, il serait possible de voir l'effet de la mutation sur la liaison à une sonde NurRE-STAT muté versus intact. La forme mutée de ce site serait évidemment la séquence utilisée en transgénèse où le NurRE est muté.

De plus, dans le but d'évaluer l'impact fonctionnel de la mutation sur la transcription, il serait possible de stimuler par le LIF les cellules AtT-20, transfectées préalablement avec le rapporteur contenant la séquence NurRE muté qui fut utilisée en transgénèse. L'activité transcriptionnelle de ce rapporteur pourrait être comparée à celle obtenue à partir d'un autre rapporteur ayant la séquence intacte. Puisque les résultats obtenus en transfection dans le contexte du promoteur entier sont habituellement peu reproductibles, l'utilisation de rapporteurs multimérisés contenant le site NurRE-STAT intact versus muté serait davantage à envisager.

Finalement, les résultats obtenus chez l'adulte nous révèlent que les sites NurRE et boîte E_{neuro} sont essentiels à l'expression de POMC au sein des deux types cellulaires hypophysaires l'exprimant, c'est-à-dire les mélanotrope du lobe intermédiaire ainsi que les corticotrope du lobe antérieur. Comparativement à la quantification de l'expression associée au transgène composé du promoteur intact, l'expression EGFP est pour ainsi dire absente, autant pour le transgène porteur d'un promoteur boîte E_{neuro} mutée que NurRE muté (figure 3.9c). De façon qualitative, on constate clairement la perte d'expression EGFP engendrée par les mutations versus un puissant signal chez l'adulte lorsque le promoteur demeure intact (figure 3.10e, f). D'ailleurs, il est difficile de confirmer que les cellules présentées en agrandissement (figure 3.10f) des hypophyses mutantes sont vraiment des cellules hypophysaires exprimant une quantité résiduelle de EGFP et non un artéfact lié à de l'autofluorescence. Ces données d'expression chez l'adulte concordent avec la diminution marquée d'activité transcriptionnelle *in vivo* obtenue antérieurement suite à la production de souris transgéniques ayant une délétion complète de la partie distale du promoteur POMC (84).

4.3 Perspectives

Le facteur bHLH NeuroD1 a été montré comme étant exprimé de façon transitoire dans les neurones en différenciation au cours de l'embryogenèse (147) de même qu'au sein de l'hypophyse en développement (84). Aussi, d'autres tissus requérant l'activité de facteurs bHLHs pour leur développement et différenciation expriment séquentiellement différents membres de cette famille de facteurs de transcription (264). Ainsi, l'absence apparente d'un phénotype drastique au cours du développement neuronal et hypophysaire

chez les souris mutantes pour NeuroD1 pourrait résulter d'une compensation de la part de d'autres bHLHs ayant des patrons d'expression chevauchant celui de NeuroD1.

Dans l'optique de poursuivre le projet, un autre étudiant du laboratoire, Lionel Budry, s'est proposé pour évaluer les candidats bHLHs potentiels exprimés dans l'hypophyse qui pourraient venir jouer un rôle redondant avec NeuroD1. Des hypophyses de souris CD1 ont été disséquées aux différents temps du développement de même que chez l'adulte. À ce stade de maturité, il fut possible de séparer les lobes intermédiaire et antérieur. Ensuite, l'ARNm fut isolé des hypophyses de chaque temps et hybridé sur une puce Affymetrix. Les profils d'expression de plusieurs facteurs ont alors été obtenus pour finalement être analysés à l'aide du logiciel Gene Spring de Silicon Genetics. Les patrons d'expression des bHLHs candidats sont représentés à la figure 4.1.

Sur la figure 4.1, nous pouvons observer la diminution d'expression de NeuroD1 aux alentours de E15-16 pour finalement atteindre un niveau faible au sein du lobe antérieur chez l'adulte. Comme déjà mentionné, NeuroD1 n'est pas présent dans le lobe intermédiaire. Le bHLH *Ascl1*, aussi appelé *Mash1*, montre un profil semblable à celui de NeuroD1 avec cependant une expression maintenue entre E15 et l'adulte. De plus, ce facteur semble être très fortement exprimé au sein des cellules mélanotropes du lobe intermédiaire. De pair avec le phénotype obtenu chez les souris transgéniques pPOMC boîte E_{neuro} mutée, où le signal EGFP est complètement éteint dans lobe intermédiaire, l'expression élevée de *Mash1* dans ce lobe fait de ce facteur un candidat de premier plan au remplacement de NeuroD1 dans le maintien de l'expression POMC au-delà de E15.

En ce qui concerne *Mash1*, la littérature indique qu'il se retrouve confiné dans le système nerveux central en développement ainsi que dans le système nerveux périphérique (264). La production de souris mutante pour ce gène n'a pas révélé de phénotype discernable au sein du système nerveux central ou dans la rétine, suggérant que les fonctions de *Mash1* pourraient être redondantes dans ces structures (264). D'ailleurs, il fut démontré qu'un autre bHLH, *Math3*, était coexprimé avec *Mash1* dans différentes régions du système nerveux central en développement (265). La redondance fonctionnelle entre ces deux facteurs a été davantage envisagée suite à la production des

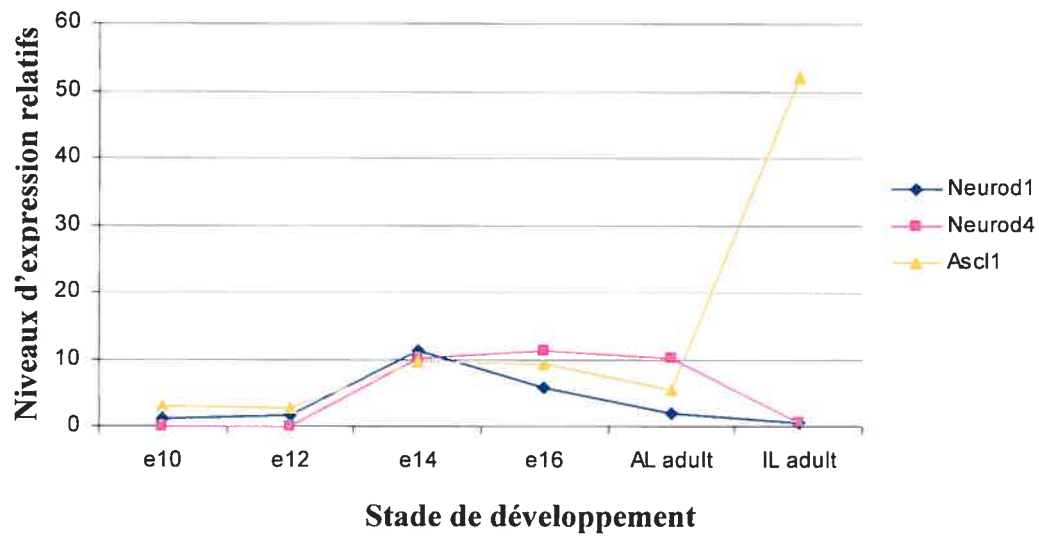


Figure 4.1: Profils d'expression hypophysaire des bHLHs ayant un rôle redondant potentiel avec NeuroD1. Les ARNm des hypophyses de souris CD1 aux différents temps du développement ont été hybridés sur une puce Affymetrix afin d'obtenir les profils d'expression représentés. Ceux-ci ont été analysés à l'aide du logiciel «Gene Spring» de «Silicon Genetics». Au temps adulte, les résultats obtenus à partir de l'ARNm des lobes antérieur (AL) et intermédiaire (IL) sont aussi représentés.

Adapté de Lionel Budry (résultats non publiés).

souris mutantes pour les deux gènes. Chez ces souris, l'apparition des neurones est bloquée au stade de précurseur neural dans les régions où les deux gènes sont coexprimés (265).

Par contre, un autre groupe, composé de Siew-Lan Ang et de ses collègues, a récemment repris les souris *Mash1*^{-/-} dans le but de vérifier son rôle dans la différenciation des cellules neuroendocrines hypothalamiques. Leur analyse s'est transposée jusqu'à l'hypophyse, mais leurs résultats n'ont révélé aucun phénotype hypophysaire concernant l'expression de POMC chez les embryons *Mash1*^{-/-} (article en soumission). Cependant, les auteurs avouent ne pas avoir porté leur analyse hypophysaire dans les moindres détails.

La figure 4.1 nous montre également le patron d'expression d'un autre bHLH, *NeuroD4* (aussi appelé *Math3*). Son profil débute d'une façon comparable à *NeuroD1* jusqu'à E14 pour ensuite conserver une expression maintenue jusqu'au temps adulte. En ce qui concerne le lobe intermédiaire, *Math3* n'y semble pas présent. Cependant, une autre étude effectuée sur les souris *NeuroD1*^{-/-} montrent un phénotype au niveau de la rétine (où *NeuroD1/4* sont exprimés) qui est semblable à celui observé dans l'hypophyse. En effet, les cellules amacrines, interneurons de la couche nucléaire interne de la rétine, ont une différenciation retardée chez les souris *NeuroD1*^{-/-}, sans toutefois montrées une quantité de cellules diminuée de façon tardive (266). À ce propos, le nombre de cellules retourne à des niveaux normaux à P12, indiquant que *NeuroD1* seul n'est pas suffisant pour le développement de ces cellules rétinienne (266). Ce phénotype pourrait être attribuable à la redondance des facteurs bHLHs. De façon similaire à *NeuroD1*, *Math3* est exprimé transitoirement par les cellules amacrines en voie de différenciation. L'inactivation de ce gène n'affecte cependant pas le développement de ces cellules (265). Par contre, la double inactivation génique de *NeuroD1* et de *Math3* entraîne une absence complète des cellules amacrines (267), témoignant ainsi d'une certaine redondance fonctionnelle entre ces bHLHs (268).

En supposant qu'un anticorps spécifique pour *Math3* soit disponible, nous pourrions premièrement vérifier la colocalisation de POMC et de *Math3* en

immunofluorescence, indiquant ainsi que ce facteur se retrouve exprimé dans les cellules d'intérêts. Par la suite, afin de vérifier le rôle potentiel de Math3 sur la transcription de POMC, des essais cis/trans en transfections sur un rapporteur contenant le promoteur POMC complet ou bien le DE2C multimérisé (qui comprend le site de liaison de NeuroD1) pourront être envisagés dans notre modèle cellulaire corticotrope AtT-20. L'utilisation de cellules hétérologues en transfections transitoires serait aussi envisageable, puisqu'elles permettraient d'augmenter les niveaux de base et par le fait même, montrer de façon plus marquée l'effet de la surexpression des différents bHLHs sur le rapporteur. De plus, des expériences de retard sur gel (EMSA) pourraient indiquer s'il existe une compétition entre les bHLHs candidats et NeuroD1 sur une sonde contenant la boîte E_{neuro} . L'ajout de bHLHs ubiquitaires tel que Pan1 sera nécessaire afin de permettre la liaison à l'ADN.

Finalement, au lieu d'effectuer une étude de profils d'expression des bHLHs à partir d'hypophyses entières, comme ce fut le cas à la figure 4.1 (utilisation de souris CD1), nous pourrions utiliser les hypophyses de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur EGFP sous le contrôle de promoteur POMC intact (lignée 862). La fluorescence obtenue nous permettrait de séparer au FACS trieur cellulaire les cellules POMC positives, tel que révélé par le signal EGFP. Ainsi, il sera possible d'effectuer le même type d'analyse développementale sur puces Affymetrix, mais à partir des cellules d'intérêts directement, plutôt qu'à partir d'hypophyses entières. De plus, la séparation des lobes antérieur et intermédiaire étant possible chez l'adulte, nous pourrions voir les niveaux d'expression des bHLHs au sein de chaque type cellulaire hypophysaire exprimant la POMC.

Références

1. Greenspan F.S., Gardner D.G. 2001 Basic and Clinical Endocrinology, ed. 6th.
2. Dasen JS, Rosenfeld MG 2001 Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* 24:327-355
3. Raffin-Sanson ML, de Keyser Y, Bertagna X 2003 Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *European Journal of Endocrinology* 149:79-90
4. Schwind J 1928 The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am J Anat* 41:295-319
5. Marieb E.N. 1999 Human anatomy and physiology, ed. 2th.
6. Scully KM, Rosenfeld MG 2002 Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295:2231-2235
7. Philips A, Maira MH, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P, Drouin J 1997 Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17:5952-5959
8. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ 2002 Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50:125-133
9. Couly G, Ledouarin NM 1988 The Fate Map of the Cephalic Neural Primordium at the Presomitic to the 3-Somite Stage in the Avian Embryo. *Development* 103:101-113
10. Eagleson GW, Harris WA 1990 Mapping of the Presumptive Brain-Regions in the Neural Plate of *Xenopus-Laevis*. *Journal of Neurobiology* 21:427-&
11. Rubenstein JLR, Shimamura K, Martinez S, Puelles L 1998 Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annual Review of Neuroscience* 21:445-477
12. Couly GF, Le Douarin NM 1985 Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol* 110:422-439
13. Kikuyama S, Inaco H, Jenks BG, Kawamura K 1993 Development of the ectopically transplanted primordium of epithelial hypophysis (anterior neural ridge) in *Bufo japonicus* embryos. *J Exp Zool* 266:216-220
14. Kouki T, Imai H, Aoto K, Eto K, Shioda S, Kawamura K, Kikuyama S 2001 Developmental origin of the rat adenohypophysis prior to the formation of Rathke's pouch. *Development* 128:959-963
15. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T 1998 Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the

emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125:1005-1015

16. Nudi M, Batsche E, Drouin J 2003 Ontogeny of the pituitary corticotroph system. In: Gaillard RC, Melmed S (eds) *The ACTH axis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Kluwer Academic Publishers, Hingham MA USA, 1-6
17. Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG 1998 Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 12:1691-1704
18. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ 1996 The *Tebp* null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 10:60-69
19. Daikoku S, Chikamori M, Adachi T, Maki Y 1982 Effect of the basal diencephalon on the development of Rathke's pouch in rats: a study in combined organ cultures. *Dev Biol* 90:198-202
20. Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP 1997 The world according to hedgehog. *Trends Genet* 13:14-21
21. Dahmann C, Basler K 1999 Compartment boundaries - at the edge of development. *Trends in Genetics* 15:320-326
22. Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahon AP, Rosenfeld MG 2001 Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 128:377-386
23. Japon MA, Rubinstein M, Low MJ 1994 In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117-1125
24. Karlstrom RO, Talbot WS, Schier AF 1999 Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target *gli2* affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev* 13:388-393
25. Ruiz I, Altaba A 1999 Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet* 15:418-425
26. Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H 1997 Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278:1809-1812
27. De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest J, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C 2000 An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 127:483-492

28. Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C 1994 Sonic Hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79:993-1003
29. Dale JK, Vesque C, Lints TJ, Sampath TK, Furley A, Dodd J, Placzek M 1997 Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90:257-269
30. Hogan BL 1996 Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580-1594
31. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S, Mahon KA 1998 Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125:4835-4840
32. Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H 1996 Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* 272:1004-1007
33. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG 1996 Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* 384:327-333
34. Gage PJ, Brinkmeier ML, Scarlett LM, Knapp LT, Camper SA, Mahon KA 1996 The ames dwarf gene, *df*, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of *rpx* transcription and initiation of lineage- specific cell proliferation. *Mol Endocrinol* 10:1570-1581
35. Yamasaki M, Miyake A, Tagashira S, Itoh N 1996 Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15918-15921
36. Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S, Itoh N 2000 FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi- organ development. *Biochem Biophys Res Commun* 277:643-649
37. Bach I, Rhodes SJ, Pearse RV2, Heinzl T, Gloss B, Scully KM, Sawchenko PE, Rosenfeld MG 1995 P-lim, a lim homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2720-2724
38. Zhadanov AB, Bertuzzi S, Taira M, Dawid IB, Westphal H 1995 Expression pattern of the murine LIM class homeobox gene Lhx3 in subsets of neural and neuroendocrine tissues. *Dev Dyn* 202:354-364

39. Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell, TM. 1996 Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84:309-320
40. Cogan JD, Wu W, Phillips JA, III, Arnhold IJ, Agapito A, Fofanova OV, Osorio MG, Bircan I, Moreno A, Mendonca BB 1998 The PROP1 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3346-3349
41. Deladoey J, Fluck C, Buyukgebiz A, Kuhlmann BV, Eble A, Hindmarsh PC, Wu W, Mullis PE 1999 "Hot spot" in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1645-1650
42. Rosenbloom AL, Almonte AS, Brown MR, Fisher DA, Baumbach L, Parks JS 1999 Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 84:50-57
43. Pernasetti F, Toledo SPA, Vasilyev VV, Hayashida CY, Cogan JD, Ferrari C, Lourenco DM, Mellon PL 2000 Impaired adrenocorticotropin-adrenal axis in combined pituitary hormone deficiency caused by a two-base pair deletion (301-302delAG) in the Prophet of Pit-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 85:390-397
44. Vallette-Kasic S, Barlier A, Teinturier C, Diaz A, Manavela M, Berthezene F, Bouchard P, Chaussain JL, Brauner R, Pellegrini-Bouiller I, Jaquet P, Enjalbert A, Brue T 2001 PROP1 gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:4529-4535
45. Smith ST, Jaynes JB 1996 A conserved region of engrailed, shared among all *en-*, *gsc-*, *Nk1-*, *Nk2-* and *msh-*class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* 122:3141-3150
46. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Martensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RS, Robinson IC 1998 Mutations in the homeobox gene *HESX1/Hesx1* associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 19:125-133
47. Hermes E, Mackem S, Mahon KA 1996 *Rpx*: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 122:41-52
48. Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, Connell SO, Olson L, Ju B, Tollkuhn J, Baek SH, Rose DW, Rosenfeld MG 2001 Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev* 15:3193-3207

49. Mead J, Zhong H, Acton TB, Vershon AK 1996 The yeast alpha2 and Mcm1 proteins interact through a region similar to a motif found in homeodomain proteins of higher eukaryotes. *Mol Cell Biol* 16:2135-2143
50. Bentley CA, Zidehsarai MP, Grindley JC, Parlow AF, Barth-Hall S, Roberts VJ 1999 Pax6 is implicated in murine pituitary endocrine function. *Endocrine* 10:171-177
51. Kioussi C, O'Connell S, St Onge L, Treier M, Gleiberman AS, Gruss P, Rosenfeld MG 1999 Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14378-14382
52. Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG 1988 A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529
53. Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M 1988 The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55:505-518
54. Camper SA, Saunders TL, Katz RW, Reeves RH 1990 The Pit-1 Transcription Factor Gene Is A Candidate for the Murine Snell Dwarf Mutation. *Genomics* 8:586-590
55. Li S, Crenshaw EBI, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG 1990 Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 347:528-533
56. Xu L, Lavinsky RM, Dasen JS, Flynn SE, McInerney EM, Mullen TM, Heinzl, T, Szeto D, Korzus E, Kurokawa R, Aggarwal AK, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG 1998 Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* 395:301-306
57. Zanger K, Cohen LE, Hashimoto K, Radovick S, Wondisford FE 1999 A novel mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of gene expression by CREB-binding protein. *Mol Endocrinol* 13:268-275
58. Schaufele F, West BL, Baxter JD 1992 Synergistic Activation of the Rat Growth-Hormone Promoter by Pit-1 and the Thyroid-Hormone Receptor. *Molecular Endocrinology* 6:656-665
59. Palomino T, Baretino D, Aranda A 1998 Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 273:27541-27547
60. Lipkin SM, Näär AM, Kalla KA, Sack RA, Rosenfeld MG 1993 Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes Dev* 7:1674-1687

61. Crenshaw III EB, Kalla K, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG 1989 Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements. *Genes Dev* 3:959-972
62. Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW 1990 Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* 4:695-711
63. Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG 1997 Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 11:674-681
64. Howard PW, Maurer RA 1995 A Composite Ets/Pit-1 Binding-Site in the Prolactin Gene Can Mediate Transcriptional Responses to Multiple Signal-Transduction Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 270:20930-20936
65. Bradford AP, Wasylyk C, Wasylyk B, GutierrezHartmann A 1997 Interaction of Ets-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 17:1065-1074
66. Buono P, Cassano S, Alfieri A, Mancini A, Salvatore F 2002 Human aldolase C gene expression is regulated by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) in PC12 cells. *Gene* 291:115-121
67. Day RN, Liu J, Sundmark V, Kawecki M, Berry D, Elsholtz HP 1998 Selective inhibition of prolactin gene transcription by the ETS-2 repressor factor. *Journal of Biological Chemistry* 273:31909-31915
68. Szeto DP, Ryan AK, OConnell SM, Rosenfeld MG 1996 P-OTX: A PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:7706-7710
69. Amendt BA, Sutherland LB, Semina EV, Russo AF 1998 The molecular basis of Rieger syndrome - Analysis of Pitx2 homeodomain protein activities. *Journal of Biological Chemistry* 273:20066-20072
70. Tremblay JJ, Lanctôt C, Drouin J 1998 The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol* 12:428-441
71. Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman, AS, Szeto DP, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG 1999 Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 97:587-598

72. Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL 1994 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8:2302-2312
73. Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavriline G, Milbrandt J 1996 Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273:1219-1221
74. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdji D, Driancourt MA, Rao CV, Charnay P 1998 Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 12:107-122
75. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, Gleiberman AS, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG 1999 Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* 13:484-494
76. Gordon DF, Lewis SR, Haugen BR, James RA, Mcdermott MT, Wood WM, Ridgway EC 1997 Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin β -subunit promoter. *J Biol Chem* 272:24339-24347
77. Parker KL, Schimmer BP 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18:361-377
78. Asa SL, Bamberger AM, Cao B, Wong M, Parker KL, Ezzat S 1996 The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2165-2170
79. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Tsai JPY, Couture C, Gauthier Y, Drouin J 2003 Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* 17:738-747
80. Luo X, Ikeda Y, Parker KL 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490
81. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL 1995 The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 9:478-486
82. Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y, Niwa O, et al 1995 Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dynamics* 204:22-29
83. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J 2001 A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859

84. Poulin G, Lebel M, Chamberland M, Paradis FW, Drouin J 2000 Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol* 20:4826-4837
85. Poulin G, Turgeon B, Drouin J 1997 NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol Cell Biol* 17:6673-6682
86. Steiner DF, Clark JL, Nolan C, Rubenstein AH, Margoliash E, Aten B 1969 Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *Recent Progress in Hormone Research* 25:207-282
87. Li CH, Barnafi L, Chrétien M, Chung D 1965 Isolation and structure of beta LPH from sheep pituitary gland. *Nature* 208:1093-1094
88. Yalow RS, Berson SA 1971 Size heterogeneity of immunoreactive human ACTH in plasma and extracts of pituitary glands and ACTH-producing thymoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44:439-445
89. Bertagna X, Nicholson WE, Sorenson GD, Pettengill OS, Mount CD, Orth DN 1978 Corticotropin, lipotropin, and β -endorphin production by human nonpituitary tumor in tissue culture: evidence for a common precursor. *PNAS* 75:5160-5164
90. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN, Numa S 1979 Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278:423-427
91. Chang AC, Cochet M, Cohen SN 1980 Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4890-4894
92. Drouin J, Goodman HM 1980 Most of the coding region of rat ACTH b-LPH precursor gene lacks intervening sequences. *Nature* 288:610-613
93. Cool DR, Zhang CF, Zhang Y, Loh YP 1995 Identification of A Specific Binding-Protein for the Regulated Secretory Pathway Sorting Signal of Proopiomelanocortin in Golgi and Secretory Granule Membranes. *Molecular Biology of the Cell* 6:1930
94. Cool DR, Zhang CF, Zhang Y, Loh YP 1995 Identification of A Specific Binding-Protein for the Regulated Secretory Pathway Sorting Signal of Proopiomelanocortin in Golgi and Secretory Granule Membranes. *Molecular Biology of the Cell* 6:1930
95. Lacaze-Masmonteil T, de Keyzer Y, Luton JP, Kahn A, Bertagna X 1987 Characterization of pro-opiomelanocortin transcription in human non-pituitary tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7261-7265

96. Debold CR, Menefee JK, Nicholson WE, Orth DN 1988 Proopiomelanocortin Gene Is Expressed in Many Normal Human-Tissues and in Tumors Not Associated with Ectopic Adrenocorticotropin Syndrome. *Molecular Endocrinology* 2:862-870
97. Texier PL, Dekeyser Y, Lacave R, Vieau D, Lenne F, Rojasmiranda A, Verley JM, Luton JP, Kahn A, Bertagna X 1991 Proopiomelanocortin Gene-Expression in Normal and Tumoral Human Lung. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73:414-420
98. Jeannotte L, Burbach JPH, Drouin J 1987 Unusual proopiomelanocortin ribonucleic acids in extrapituitary tissues: intronless transcripts in testes and long poly(A) tails in hypothalamus. *Mol Endocrinol* 1:749-757
99. Gee CE, Chen CLC, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ 1983 Identification of pro-opiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 306:374-376
100. Civelli O, Birnberg N, Herbert E 1982 Detection and quantification of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J Biol Chem* 257:6783-6787
101. Dickerson IM, Noel G 1991 Tissue-specific peptide processing. CRC Press, Boca Rato71-109
102. Eipper B, Mains R 1980 Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr Rev* 1:1-27
103. Rosa PA, PolICASTRO P, Herbert E 1980 A cellular basis for the differences in regulation of synthesis and secretion of ACTH/endorphin peptides in anterior and intermediate lobes of the pituitary. *J Exp Biol* 89:215-237
104. Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA 1994 Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest* 93:2258-2262
105. Wintzen M, Gilchrest BA 1996 Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin. *J Invest Dermatol* 106:3-10
106. Scholzen TE, Brzoska T, Kalden DH, Hartmeyer M, Luger TA, Armstrong CA, Ansel JC 1999 Expression of proopiomelanocortin peptides and prohormone convertases by human dermal microvascular endothelial cells. *Cutaneous Neuroimmunomodulation: the Proopiomelanocortin System* 885:444-447
107. Bertagna X, Camus F, Lenne F, Girard F, Luton JP 1988 Human Joining Peptide - A Proopiomelanocortin Product Secreted As A Homodimer. *Molecular Endocrinology* 2:1108-1114

108. Bertagna X, Lenne F, Comar D, Mssias JF, Wajcman H, Baudin V, et al. 1986 Human beta-melanocyte-stimulating hormone revisited. *PNAS* 83:9719-9723
109. Bertagna X, Seurin D, Pique L, Luton JP, Bricaire H, Girard F 1983 Peptides Related to the Nh2-Terminal End of Proopiomelanocortin in Man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 56:489-495
110. Shaha C, Margioris A, Liotta AS, Krieger DT, Bardin CW 1984 Demonstration of Immunoreactive Beta-Endorphin-Melanocyte and Gamma-3-Melanocyte-Stimulating Hormone-Related Peptides in the Ovaries of Neonatal, Cyclic, and Pregnant Mice. *Endocrinology* 115:378-384
111. Liotta AS, Krieger DT 1980 Invitro Biosynthesis and Comparative Posttranslational Processing of Immunoreactive Precursor Corticotropin-Beta-Endorphin by Human Placental and Pituitary-Cells. *Endocrinology* 106:1504-1511
112. Liotta AS, Houghten R, Krieger DT 1982 Identification of a beta-endorphin-like peptide in cultured human placental cells. *Nature* 295:593-595
113. Seidah NG, Marcinkiewicz M, Benjannet S, Gaspar L, Beaubien G, Mattei MG, Lazure C, Mbikay M, Chrétien M 1991 Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol* 5:111-122
114. Smeekens SP, Steiner DF 1990 Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem* 265:2997-3000
115. Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chrétien M, Seidah NG 1991 PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3564-3568
116. Day R, Schafer MKH, Watson SJ, Chrétien M, Seidah NB 1992 Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol Endocrinol* 6:485-497
117. Zhou A, Bloomquist BT, Mains RE 1993 The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. *J Biol Chem* 268:1763-1769
118. Friedman TC, Loh YP, Birch NP 1994 In-Vitro Processing of Proopiomelanocortin by Recombinant Pcl (Spc3). *Endocrinology* 135:854-862
119. Peytremann A, Nicholson WE, Brown RD, Liddle GW, Hardman JG 1973 Comparative effects of angiotensin and ACTH on cyclic AMP and steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. *Journal of Clinical Investigation* 52:835-842

120. Li SJ, Varga K, Archer P, Hruby VJ, Sharma SD, Kesterson RA, Cone RD, Kunos G 1996 Melanocortin antagonists define two distinct pathways of cardiovascular control by alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormones. *J Neurosci* 16:5182-5188
121. Texier PL, Dekeyser Y, Lacave R, Vieau D, Lenne F, Rojasmiranda A, Verley JM, Luton JP, Kahn A, Bertagna X 1991 Proopiomelanocortin Gene-Expression in Normal and Tumoral Human Lung. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73:414-420
122. Cone R, Lu D, Koppula S, Vage D, Klungland H, Boston B, et al 1996 The melanocortin receptors: agonists, antagonists and the hormonal control of pigmentation. *Recent Progress in Hormone Research* 51:287-318
123. Schioth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JES, Rees JL 1999 Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260:488-491
124. Coll AP 2004 Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2557-2562
125. Estivariz FE, Iturriza F, McLean C, Hope J, Lowry PJ 1982 Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiocortin peptides. *Nature* 297:419-422
126. Estivariz FE, Carino M, Lowry PJ, Jackson S 1988 Further evidence that N-terminal pro-opiomelanocortin peptides are involved in adrenal mitogenesis. *J Endocrinol* 116:201-206
127. Catania A, Lipton JM 1993 alpha-Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions. *Endocr Rev* 14:564-576
128. Jeannotte L, Trifiro MA, Plante RK, Chamberland M, Drouin J 1987 Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol Cell Biol* 7:4058-4064
129. Tremblay Y, Tretjakoff I, Peterson A, Antakly T, Zhang CX, Drouin J 1988 Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8890-8894
130. Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ 1992 Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary gland of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:3978-3990
131. Liu B, Mortrud M, Low MJ 1995 DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice. *Biochem J* 312 (Pt 3):827-832

132. Therrien M, Drouin J 1991 Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol Cell Biol* 11:3492-3503
133. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J 1996 PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* 10:1284-1295
134. Young JI, Otero V, Cerdan MG, Falzone TL, Chan EC, Low MJ, Rubinstein M 1998 Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J Neurosci* 18:6631-6640
135. Kraus J, Buchfelder M, Holtt V 1993 Regulatory elements of the human proopiomelanocortin gene promoter. *DNA Cell Biol* 12:527-536
136. Tsukada T, Nakai Y, Fukushima M, Usui T, Imura H, Takebe H 1994 Functional analysis of the cell-specific enhancer in the human proopiomelanocortin gene by beta-galactosidase histochemical staining. *DNA Cell Biol* 13:755-762
137. Jin WD, Boutillier AL, Glucksman MJ, Salton SR, Loeffler JP, Roberts JL 1994 Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein. *Mol Endocrinol* 8:1377-1388
138. Drouin J, Trifiro MA, Plante RK, Nemer M, Eriksson P, Wrange Ö 1989 Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* 9:5305-5314
139. Riegel AT, Remenick J, Wolford RG, Berard DS, Hager GL 1990 A novel transcriptional activator (PO-B) binds between the TATA box and cap site of the pro-opiomelanocortin gene. *Nucleic Acids Res* 18:4513-4521
140. Bishop JF, Rinaudo MS, Ritter JK, Chang AC, Conant K, Gehlert DR 1990 A putative AP-2 binding site in the 5' flanking region of the mouse POMC gene. *FEBS Lett* 264:125-129
141. Boutillier AL, Sassone-Corsi P, Loeffler JP 1991 The protooncogene *c-fos* is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 5:1301-1310
142. Guerrero MR, McEvilly RJ, Turner E, Lin CR, O'Connell S, Jenne KJ, Hobbs MV, Rosenfeld MG 1993 Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10841-10845

143. Picon A, Bertagna X, de Keyzer Y 1999 Analysis of the human proopiomelanocortin gene promoter in a small cell lung carcinoma cell line reveals an unusual role for E2F transcription factors. *Oncogene* 18:2627-2633
144. Therrien M, Drouin J 1993 Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13:2342-2353
145. Naya FJ, Stellrecht CMM, Tsai MJ 1995 Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9:1009-1019
146. Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, Leiter AB 1997 The basic helix-loop-helix transcription factor beta2/neurod is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3560-3564
147. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H 1995 Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268:836-844
148. Oyama K, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY 2001 Expression of neuro D1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol* 14:892-899
149. Lamolet B, Poulin G, Chu K, Guillemot F, Tsai MJ, Drouin J 2004 Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol Endocrinol* 18:995-1003
150. Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H 1991 Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66:305-315
151. Ohneda K, Mirmira RG, Wang JH, Johnson JD, German MS 2000 The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 20:900-911
152. Lanctôt C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J 1999 Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* 126:1805-1810
153. Suh H, Gage PJ, Drouin J, Camper SA 2002 *Pitx2* is required at multiple stages of pituitary organogenesis : pituitary primordium formation and cell specification. *Development* 129:329-337
154. Yost HJ 2001 Establishment of left-right asymmetry. *Int Rev Cytol* 203:357-381
155. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC 1996

- Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* 14:392-399
156. Smidt MP, van Schaick HS, Lanctôt C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AA, Wolterink G, Drouin J, Burbach JP 1997 A homeodomain gene *Ptx3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13305-13310
 157. Tremblay JJ, Goodyer CG, Drouin J 2000 Transcriptional properties of *Ptx1* and *Ptx2* isoforms. *Neuroendocrinol* 71:277-286
 158. Tremblay JJ, Drouin J 1999 *Egr-1* is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with *Ptx1* and *SF-1* to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol Cell Biol* 19:2567-2576
 159. Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y, Drouin J 1999 *Ptx1* regulates *SF-1* activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J* 18:3431-3441
 160. Drouin J, Lamolet B, Lamonerie T, Lanctôt C, Tremblay JJ 1998 The *Ptx* family of homeodomain transcription factors during pituitary development. *Mol Cell Endocrinol* 140:31-36
 161. Gage PJ, Suh HY, Camper SA 1999 Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development* 126:4643-4651
 162. Smith J 1999 T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet* 15:154-158
 163. Papaioannou VE 2001 T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol* 207:1-70
 164. Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL 2001 *Tbr1* regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* 29:353-366
 165. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH 2000 A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669
 166. Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG 1990 Expression pattern of the mouse *T* gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343:657-659
 167. Kispert A, Herrmann BG 1993 The *Brachyury* gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* 12:4898-4899
 168. Nemeskeri A, Setalo G, Halasz B 1988 Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohypophysis. A detailed immunohistochemical analysis. *Neuroendocrinol* 48:534-543

169. Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J 1999 Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 140:1416-1422
170. Burke CW 1985 Adrenocortical insufficiency. *Clin Endocrinol Metab* 14:947-976
171. Malpuech G, Vanlieferinghen P, Dechelotte P, Gaulme J, Labbe A, Guiot F 1988 Isolated familial adrenocorticotropin deficiency: prenatal diagnosis by maternal plasma estriol assay. *Am J Med Genet* 29:125-130
172. Hentze MW, Kulozik AE 1999 A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96:307-310
173. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M, Malpuech G, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, Drouin J 2003 Human and mouse Tpit gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* 17:711-716
174. Vallette-Kasic S, Brue T, Pulichino AM, Gueydan M, Barlier A, David M, Nicolino M, Malpuech G, Déchelotte P, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, de Zegher F, Beckers D, Kylo J, Donohoue P, Fassnacht M, Hahner S, Allolio B, Noordam C, Dunkel L, Hero M, Pigeon B, Weill J, Yigit S, Brauner R, Heinrich JJ, Cummings E, Riddell C, Enjalbert A, Drouin J 2005 Congenital isolated adrenocorticotropin deficiency: an underestimated cause of neonatal death, explained by TPIT gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1323-1331
175. Metherell LA, Savage MO, Dattani M, Walker J, Clayton PE, Clark AJL 2003 Absence of TPIT (Tbx19) gene mutations in most patients with isolated ACTH deficiency. *Horm Res Suppl* 2:152-153
176. Newell-Price J, King P, Clark AJ 2001 The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. *Mol Endocrinol* 15:338-348
177. Lugo DI, Pintar JE 1996 Ontogeny of basal and regulated secretion from POMC cells of the developing anterior lobe of the rat pituitary gland. *Dev Biol* 173:95-109
178. Tsigos C, Chrousos GP 2002 Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53:865-871
179. Perrin MH, Vale WW 1999 Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann NY Acad Sci* 885:312-328
180. Maira MH, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, Drouin J 2003 Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Mol Cell Biol* 23:763-776

181. Montminy M 1997 Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66:807-822
182. Spaulding SW 1993 The ways in which hormones change cyclic adenosine 3',5'-monophosphate- dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior. *Endocr Rev* 14:632-650
183. Kuryshev YA, Childs GV, Ritchie AK 1996 Corticotropin-releasing hormone stimulates Ca^{2+} entry through L- and P-type Ca^{2+} channels in rat corticotropes. *Endocrinology* 137:2269-2277
184. Labrie F, Veilleux R, Lefevre G, Coy DH, Sueiras-Diaz J, Schally AV 1982 Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs. *Science* 216:1007-1008
185. Reisine T, Rougon G, Barbet J, Affoter HU 1985 Corticotropin-releasing factor-induced adrenocorticotropin-hormone release and synthesis is blocked by incorporation of the inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase into anterior pituitary tumor cells by liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8261-8265
186. Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E 2002 Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 16:1638-1651
187. Gagner J-P, Drouin J 1985 Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Mol Cell Endocrinol* 40:25-32
188. Gagner J-P, Drouin J 1987 Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1:677-682
189. Licinio J, Bongiorno PB, Gold PW, Wong ML 1995 The gene encoding for the novel transacting factor proopiomelanocortin corticotropin-releasing hormone responsive element binding protein 1 (PCRH-REB-1) is constitutively expressed in rat pituitary and in discrete brain regions containing CRH or CRH receptors: pathophysiological implications. *Endocrinology* 136:4709-4712
190. Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, Lundblad JR, Roberts JL, Loeffler JP 1995 Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol Endocrinol* 9:745-755
191. Autelitano DJ, Cohen DR 1996 CRF stimulates expression of multiple fos and jun related genes in the AtT-20 corticotroph cell. *Mol Cell Endocrinol* 119:25-35

192. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17:5946-5951
193. Maira MH, Martens C, Philips A, Drouin J 1999 Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 19:7549-7557
194. Milbrandt J 1988 Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1:183-188
195. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW 1992 Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6:2129-2135
196. Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K 1994 Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1959-1965
197. Enmark E, Gustafsson JA 1996 Orphan nuclear receptors - the first eight years. *Mol Endocrinol* 10:1293-1307
198. Hazel TG, Nathans D, Lau LF 1988 A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8444-8448
199. Davis IJ, Lau LF 1994 Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14:3469-3483
200. Honkaniemi J, Kononen J, Kainu T, Pyykonen I, Pelto-Huikko M 1994 Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res* 25:234-241
201. Parkes D, Rivest S, Lee S, Rivier C, Vale W 1993 Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol Endocrinol* 7:1357-1367
202. Murphy EP, Conneely OM 1997 Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 11:39-47
203. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J 1991 Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300
204. Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL 1993 The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 13:861-868

205. Cheng LEC, Chan FKM, Cado D, Winoto A 1997 Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 16:1865-1875
206. Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA 1994 Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T- cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 367:281-284
207. Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A 1994 Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367:277-281
208. Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao XH, Hobbs PD, Lin BZ, Chen GQ, Lu LS, Lin F, Xie ZH, Fontana JA, Reed JC, Zhang Xk 2000 Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289:1159-1164
209. Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA, Milbrandt J 1992 Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 256:107-110
210. Paulsen RE, Granas K, Johnsen H, Rolseth V, Sterri S 1995 Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. *J Mol Neurosci* 6:249-255
211. Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T 1996 Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10:1656-1666
212. Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans RM 1995 Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81:541-550
213. Perlmann T, Jansson L 1995 A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9:769-782
214. Wu Q, Li Y, Liu R, Agadir A, Lee MO, Liu Y, Zhang X 1997 Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J* 16:1656-1669
215. Crawford PA, Sadovsky Y, Woodson K, Lee SL, Milbrandt J 1995 Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 15:4331-16
216. Conneely OM, Satyamoorthy K, Saucedo-Cardenas O, De Mayo F, Neurodevelopmental role of the orphan nuclear receptor, Nurr1. (Abstract)
217. Davis S 1993 The molecular biology of the CNTF receptor. *Curr Opin Cell Biol* 5:281-285

218. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosley B, Ziegler SF, Cosman D 1992 The Il-6 Signal Transducer, Gp130 - An Oncostatin-M Receptor and Affinity Converter for the Lif Receptor. *Science* 255:1434-1437
219. Hirano T. 1998 Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16:249-284
220. Taga T, Kishimoto T 1997 gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual Review of Immunology* 15:797-819
221. Nakashima K, Taga T 1998 gp130 and the IL-6 family of cytokines: Signaling mechanisms and thrombopoietic activities. *Seminars in Hematology* 35:210-221
222. Taupin JL 1998 Leukemia inhibitory factor: part of a large ingathering family. *Int Rev Immunol* 16:397-426
223. Brown MA, Metcalf D, Gough NM 1994 Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 Are Expressed at Very-Low Levels in the Normal Adult-Mouse and Are Induced by Inflammation. *Cytokine* 6:300-309
224. Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P 1998 Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *Journal of Immunology* 161:409-414
225. Geisterfer M, Gauldie J 1996 Regulation of signal transducer, GP130 and the LIF receptor in acute inflammation in vivo. *Cytokine* 8:283-287
226. Grosset C, Jazwiec B, Taupin JL, Liu HQ, Richard S, Mahon FX, Reiffers J, Moreau JF, Ripoché J 1995 In-Vitro Biosynthesis of Leukemia Inhibitory Factor Human Interleukin for da Cells by Human Endothelial-Cells - Differential Regulation by Interleukin-1-Alpha and Glucocorticoids. *Blood* 86:3763-3770
227. Carter DA 1995 Leukemia Inhibitory Factor Expression in Cultured Rat Anterior-Pituitary Is Regulated by Glucocorticoids. *Journal of Neuroendocrinology* 7:623-628
228. Grosset C, Taupin JL, Lemerrier C, Moreau JF, Reiffers J, Ripoché J 1999 Leukaemia inhibitory factor expression is inhibited by glucocorticoids through post-transcriptional mechanisms. *Cytokine* 11:29-36
229. Wang Z RSMS 1996 Hypothalamic and pituitary leukemia inhibitory factor gene expression in vivo: a novel endotoxin-inducible neuro-endocrine interface. *Endocrinology* 139:2947-2953
230. Auernhammer CJ, Chesnokova V, Melmed S 1998 Leukemia inhibitory factor modulates interleukin-1beta-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 139:2201-2208

231. Akita S, Webster J, Ren SG, Takino H, Said J, Zand O, Melmed S 1995 Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 95:1288-1298
232. Ray DW, Ren SG, Melmed S 1996 Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest* 97:1852-1859
233. Auernhammer CJ, Chesnokova V, Bousquet C, Melmed S 1998 Pituitary corticotroph SOCS-3: novel intracellular regulation of leukemia-inhibitory factor-mediated proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion. *Mol Endocrinol* 12:954-961
234. Ray DW, Ren SG, Melmed S 1998 Leukemia inhibitory factor regulates proopiomelanocortin transcription. *Neuroimmunomodulation* 840:162-173
235. Bousquet C, Melmed S 1999 Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropin hormone leukemia inhibitory factor signaling. *J Biol Chem* 274:10723-10730
236. Bousquet C, Ray DW, Melmed S 1997 A common pro-opiomelanocortin-binding element mediates leukemia inhibitory factor and corticotropin-releasing hormone transcriptional synergy. *J Biol Chem* 272:10551-10557
237. Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S 2000 Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106:1417-1425
238. Yano H, Readhead C, Nakashima M, Ren SG, Melmed S 1998 Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immuno-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol* 12:1708-1720
239. Stefana B, Ray DW, Melmed S 1996 Leukemia inhibitory factor induces differentiation of pituitary corticotroph function: an immuno-neuroendocrine phenotypic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12502-12506
240. Chesnokova V, Auernhammer CJ, Melmed S 1998 Murine leukemia inhibitory factor gene disruption attenuates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress response. *Endocrinology* 139:2209-2216
241. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839
242. Payvar FP, de Franco D, Firestone GL, Edgar B, Wrange Ö, Okret S, Gustafsson J-Å, Yamamoto KR 1983 Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* 35:381-392

243. Nakai Y, Usui T, Tsukada T, Takahashi H, Fukata J, Fukushima M, Senoo K, Imura H 1991 Molecular mechanisms of glucocorticoid inhibition of human proopiomelanocortin gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:301-306
244. Hammer GD, Fairchild-Huntress V, Low MJ 1990 Pituitary-specific and hormonally regulated gene expression directed by the rat proopiomelanocortin promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 4:1689-1697
245. Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De Léan A, Nemer M, Schmidt TJ 1993 Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 12:145-156
246. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park K-K, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P 1990 Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62:1189-1204
247. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M 1990 Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62:1205-1215
248. Beato M, Herrlich P, Schutz G 1995 Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857
249. McKay LI, Cidlowski JA 1998 Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 12:45-56
250. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schutz G 1995 Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9:1608-1621
251. Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC 1994 A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13:4087-4095
252. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G 1998 DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93:531-541
253. Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA 1995 Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* 373:427-432
254. Muglia LJ, Bethin KE, Jacobson L, Vogt SK, Majzoub JA 2000 Pituitary-adrenal axis regulation in CRH-deficient mice. *Endocr Res* 26:1057-1066

255. Nordeen SK 1988 Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques* 6:454-456
256. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM 1991 Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65:1255-1266
257. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J 2001 A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849-859
258. Lanctot C, Gauthier Y, Drouin J 1999 Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 140:1416-1422
259. Saucedo-Cardenas O, Conneely OM 1996 Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 7:51-63
260. Maira MH, Couture C, Le Martelot G, Pulichino AM, Bilodeau S, Drouin J 2003 The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 coactivators and mediates hormone action. *J Biol Chem* 278:46523-46532
261. Helle V, Petersen, Jan N, Jensen, Roland Stein, Palle Serup 2002 Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS letters* 528:241-245
262. Lugo DI, Pintar JE 1996 Ontogeny of basal and regulated proopiomelanocortin-derived peptide secretion from fetal and neonatal pituitary intermediate lobe cells: melanotrophs exhibit transient glucocorticoid responses during development. *Dev Biol* 173:110-118
263. Mynard V, Latchoumanin O, Guignat L, Devin-Leclerc J, Bertagna X, Barré B, Fagart J, Coqueret O, Catelli MG 2006 Synergistic signaling by Corticotropin-Releasing-Hormone and the Leukemia Inhibitory Factor bridged by phosphorylated 3', 5'-cyclic Adenosine Monophosphate response element binding protein at the Nur Response Element (NurRE)-Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Element of the Proopiomelanocortin promoter. *Mol Endocrinol* 18:2997-3010
264. Lee JE 1997 Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Neurobiol* 7:13-20
265. Tomita K, Moriyoshi K, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R 2000 Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *EMBO J* 19:5460-5472
266. Morrow E.M, Furukawa T, Lee JE, Cepko C.I. 1999 NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126:23-36

267. Inoue T, Hojo M, Bessho Y, Tano Y, Lee JE, Kageyama R 2002 Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129:831-842
268. Hatakeyama J, Kageyama R 2003 Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Cell and Developmental Biology* 15:83-89

